

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan, 2018.

Marta Keškić

919/PI

UTJECAJ STARTER KULTURA NA SVOJSTVA SVJEŽEG SIRA

**INFLUENCE OF STARTER
CULTURES ON THE PROPERTIES
OF FRESH CHEESE**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju mlijeka i mliječnih proizvoda na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom dr. sc. Irene Barukčić, doc. Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć doc. dr. sc. Katarine Lisak Jakopović i Snježane Šimunić, tehničke suradnice.

ZAHVALA

Prije svega željela bih uputiti zahvale svojoj mentorici, doc. dr. sc. Ireni Barukčić, na ukazanom povjerenju, uloženom vremenu i trudu, ali i na ugodnoj atmosferi koju je stvorila pri izradi ovog diplomskog rada.

Srdačno se zahvaljujem i doc. dr. sc. Katarini Lisak Jakopović na stručnoj pomoći te korisnim savjetima. Također bih se željela zahvaliti prof.dr.sc. Rajki Božanić na kvalitetnoj podlozi iz kolegija „Tehnologija mlijeka i mliječnih proizvoda“ te na prenesenom znanju.

Veliko hvala Snježani Šimunić na podršci i pomoći tijekom izrade diplomskog rada u laboratoriju, te tehničarima Darjanu Pipiću i Goranu Bosancu.

Hvala dr.sc. Editi Jurag iz tvrtke Atera d.o.o. koja je ustupila mljekarske kulture. Zahvaljujem i dr.sc. Nini Bilandžić i dipl.inž Mariju Sedak s Hrvatskog veterinarskog instituta koji su proveli analizu mineralnog sastava u uzorcima sira.

Želim se zahvaliti svim svojim kolegama i prijateljima koji su svakim danom stvarali lijepe fakultetske uspomene te bili podrška.

Najveću zahvalu za ovo što sam postigla dugujem svojim roditeljima, braći te baki i dedi koji su mi omogućili studiranje, poticali me i podržavali kroz sve godine studiranja i radovali se mojim uspjesima.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za prehrambeno - tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju mlijeka i mliječnih proizvoda

Diplomski rad

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

UTJECAJ STARTER KULTURA NA SVOJSTVA SVJEŽEG SIRA

Marta Keškić 919/PI

Sažetak: Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj starter i protektivnih kultura na svojstva svježeg sira. Svježi sir proizveden je od pasteriziranog mlijeka na nekoliko različitih načina koji su uključivali primjenu samo mezofilne kulture, primjenu kombinacije mezofilne kulture i sirila, te primjenu protektivne kulture. Svim proizvedenim uzorcima sireva određivala se kiselost (aktivna i titracijska), mikrobiološka kvaliteta, tekstura i boja te senzorska svojstva. Prvi je dan sirevima određen udio mliječne masti, pepeo, udio suhe tvari i proteina te prinos. Tijekom skladištenja kiselost je padala, a broj naraslih kolonija mikroorganizama postupno rastao. Promjene kod sira proizvedenog uz dodatak protektivne kulture bile su znatno usporene. Senzorske su ocjene bile visoke sve dane skladištenja te je sir uz dodatak protektivne kulture imao najbolje senzorske ocjene (18,56). Nakon mikrobioloških, senzorskih i fizikalno- kemijskih analiza zaključeno je da je rok trajnosti za sir proizveden uz dodatak protektivne kulture produžen za 12 dana u odnosu na ostale uzorke te iznosi 21 dan.

Ključne riječi: svježi sir, pasterizirano mlijeko, protektivne kulture, trajnost, senzorska analiza

Rad sadrži: 68 stranica, 7 slika, 18 tablica, 73 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: doc. dr. sc. Irena Barukčić

Pomoć pri izradi: doc. dr. sc. Katarina Lisak Jakopović, Snježana Šimunić, teh.sur.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. doc.dr.sc. Katarina Lisak Jakopović
2. doc.dr.sc. Irena Barukčić
3. prof.dr.sc. Ksenija Markov
4. prof.dr.sc. Ksenija Marković (zamjena)

Datum obrane: 20. rujna 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Technology and Engineering
Laboratory of Technology of Milk and Milk Products

Graduate Thesis

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food technology

INFLUENCE OF STARTER CULTURES ON THE PROPERTIES OF FRESH CHEESE

Marta Keškić, 919/PI

Abstract: The aim of this study was to examine the influence of starter and protective cultures on the properties of fresh cheese. Fresh cheeses were produced from pasteurized milk in few different ways, by adding mesophilic starter cultures, mesophilic cultures and liquid rennet and by adding protective culture. On all samples it was analysed acidity (active and titratable), microbiological quality, texture and colour and sensory analysis. First day was also analysed milk fat, ashes, dry matter and protein content and yield. During storage acidity was decreased and number of microorganisms increased. Changes in cheese produced by adding of protective culture were significantly slowed down. Scores of sensory evaluations were high for all days of storage and cheese made by adding of protective culture had best result (18.56). After microbiological, sensory and physico-chemical analyses it is concluded that shelf life for the cheese made by adding protective culture is prolonged for 12 days and it was 21 day.

Keywords: fresh cheese, pasteurized milk, protective cultures, shelf life, sensory analysis

Thesis contains: 68 pages, 7 figures, 18 tables, 73 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: PhD *Irena Barukčić*, Assistant Professor

Technical support and assistance: PhD *Katarina Jakopović Lisak*, *Snježana Šimunić*, *tech.associate*

Reviewers:

1. PhD Katarina Lisak Jakopović, Assistant Professor
2. PhD Irena Barukčić, Assistant Professor
3. PhD Ksenija Markov, Full Professor
4. PhD Ksenija Marković, Full Professor (substitute)

Thesis defended: 20th September, 2018.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. DEFINICIJA SIRA	2
2.2. PROIZVODNJA SVJEŽEG SIRA	3
2.3. MIKROBNE KULTURE U PROIZVODNJI SVJEŽEG SIRA	5
2.3.1. Mezofilne kulture	5
2.3.2. Protektivne kulture	7
2.4. ČIMBENICI KVARENJA SVJEŽEG SIRA	9
2.4.1. Mikrobiološki čimbenici kvarenja	9
2.4.2. Ostali čimbenici kvarenja	13
2.5. Karakteristike i senzorska svojstva svježeg sira	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO	16
3.1. MATERIJALI	16
3.2. METODE	17
3.2.1.1. Proizvodnja sira mezofilnom kulturom	19
3.2.1.2. Proizvodnja 2. serije sira	21
3.2.1.3. Proizvodnja 3. serije sira	21
3.2.2. Određivanje udjela suhe tvari u mlijeku i siru	23
3.2.2.1. Direktna metoda za određivanje ukupne suhe tvari	23
3.2.3. Određivanje udjela proteina u mlijeku i siru modificiranom metodom po Kjeldahlu-referentna metoda	24
3.2.4. Određivanje udjela mliječne masti	25
3.2.4.1. Određivanje udjela mliječne masti u mlijeku butirometrijskom metodom prema Gerberu	25
3.2.4.2. Određivanje udjela mliječne masti u siru metodom po Gerber-Siegfeld-Teichertu	26
3.2.5. Određivanje kiselosti	27
3.2.5.1. Određivanje kiselosti pH metrom	27
3.2.5.2. Određivanje titracijske kiselosti (Kiselost po Soxhelt-Henkelu)	28
Kiselost mlijeka po Soxhelt-Henkelu	28
Određivanje titracijske kiselosti sira	28
3.2.6. Mikrobiološke analize sira i mlijeka	29

3.2.6.1. Priprema fiziološke otopine	29
3.2.6.2. Priprema otopine natrijevog citrata dihidrata	30
3.2.6.3. Priprema mikrobiološke podloge za određivanje ukupnog broja bakterija	30
3.2.6.4. Priprema mikrobiološke podloge za određivanje ukupnog broja bakterija, broja kvasaca i plijesni te broja enterobakterija	31
3.2.6.5. Priprema mikrobiološke podloge za određivanje koagulaza pozitivnih stafilokoka	31
3.2.6.6. Priprema uzoraka za mikrobiološko ispitivanje.....	32
3.2.6.7. Nacjepljivanje i inkubacija ukupnog broja bakterija te kvasaca i plijesni.....	32
3.2.6.8. Nacjepljivanje i inkubacija Enterobacteriae i koagulaza pozitivnih Staphylococca	33
3.2.7. Senzorska analiza	34
3.2.8. Boja i tekstura sira.....	37
3.2.8.1. Boja sira	37
3.2.8.2. Tekstura sira.....	38
3.2.9. Određivanje koncentracije mineralnih tvari u mlijeku i svježim sirevima	38
4. REZULTATI I RASPRAVA	41
4.1. PRINOS SIRA, UDIO SUHE TVARI, PROTEINA I MLIJEČNE MASTI	42
4.2. KISELOST SIRA	44
4.3. MIKROBIOLOŠKA ANALIZA SVJEŽEG SIRA	46
4.3.1. Ukupan broj mikroorganizama.....	46
4.3.2. Ukupan broj kvasaca i plijesni	47
4.3.3. Ukupan broj <i>Staphylococcus aureus</i> tijekom skladištenja.....	49
4.3.4. Ukupan broj enterobakterija.....	50
4.4. SENZORSKA ANALIZA.....	51
4.5. TEKSTURA I BOJA.....	57
4.6. MINERALNI SASTAV	60
5. ZAKLJUČCI:	61
6. LITERATURA.....	62

1.UVOD

Sir je proizvod koji se tradicionalno koristi i ima važnu ulogu u prehrani ljudi tijekom stoljeća. Prema definiciji sirevi su svježi proizvodi ili proizvodi s različitim stupnjem zrelosti koji se proizvode odvajanjem sirutke nakon koagulacije mlijeka (kravljeg, ovčjeg, kozjeg, bivoljeg mlijeka i/ili njihovih mješavina), obranog ili djelomično obranog mlijeka, vrhnja, sirutke, ili kombinacijom navedenih sirovina (Tratnik i Božanić, 2012).

Širok raspon različitih dostupnih sireva temelji se uglavnom na regionalnim uvjetima i tehnologiji proizvodnje, koja se tijekom vremena više puta prilagođavala i optimizirala. Glavni cilj je uvijek bio, i još uvijek je, pretvoriti mlijeko, koje je lako kvarljiva sirovina, u proizvod dužeg roka trajanja uz očuvanje hranjive vrijednosti (Hinrichs, 2001). Kvaliteta sira, osim o provedbi tehnološkog procesa proizvodnje, ponajviše ovisi o dobroj kemijskoj i mikrobiološkoj kvaliteti mlijeka (Fox i sur., 2004). U usporedbi s tvrdim sirevima, svježi sirevi imaju visok postotak vlage što ih čini idealnim medijem za rast mikroorganizama.

Kako bi se produžio rok trajanja proizvoda uvode se nove metode i načini proizvodnje svježeg sira. Jedan od njih je dodatak protektivnih kultura. Protektivne kulture su bakterijske kulture koje se dodaju u proizvodnji prehrambenih proizvoda, kako bi mu produžile rok trajanja i spriječile rast nepoželjnih mikroorganizama (Anonymous 1, 2018).

Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj starter i protektivnih kultura na svojstva svježeg sira. Svježi sir proizveden je od pasteriziranog mlijeka na nekoliko različitih načina koji su uključivali primjenu samo mezofilne kulture, primjenu kombinacije mezofilne kulture i sirila, te primjenu protektivne kulture.

Svim proizvedenim uzorcima sireva određivala se kiselost (aktivna i titracijska), mikrobiološka kvaliteta, tekstura i boja, senzorska svojstva i udio suhe tvari. Prvi je dan sirevima određen i udio mliječne masti, pepeo, udio proteina te prinos.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. DEFINICIJA SIRA

Sir se definira i kao fermentiran ili nefermentiran proizvod dobiven nakon zgrušavanja mlijeka, obranog mlijeka ili djelomično obranog mlijeka, vrhnja, mlaćenice ili kombinacijom navedenih sirovina uz izdvajanje sirutke (uz dodatak sirila ili nekoga drugog zamjenskog enzima zgrušavanja) (Kalit, 2015). U proizvodnji sireva dozvoljena je upotreba mljekarskih kultura, sirila i/ili drugih odgovarajućih koagulacijskih enzima i/ili dozvoljenih kiselina za koagulaciju (Pravilnik, 2013). Prema udjelu vode u bezmasnoj tvari sira sireve dijelimo na svježe, meke, polutvrde, tvrde i ekstra tvrde (Tratnik i Božanić, 2012). Sir je složeni sustav sastavljen od proteina, masti i ugljikohidrata te sadrži veliki broj enzima i mikroorganizama. Njihovom aktivnošću nezreli sir prevodi se u konačni proizvod i to prvenstveno zbog proteolize, lipolize i glikolize (Fox i sur., 2004).

Tablica 1. Naziv sira s obzirom na udio vode u bezmasnoj tvari sira (Pravilnik, 2013)

Naziv sira obzirom na udio vode u bezmasnoj tvari sira	Udio vode u bezmasnoj tvari sira (%)
Ekstra tvrdi sir	<51
Tvrdi sir	49 – 56
Polutvrdi sir	54 – 69
Meki sir	>67
Svježi sir*	69 – 85

*ne odnosi se na svježe sireve proizvedene od vrhnja

Svježi sir je proizvod dobiven zgrušavanjem pasteriziranog mlijeka pomoću čiste mezofilne kulture ili mezofilne kulture i sirila. Tu vrstu sira karakterizira visok sadržaj vode, niski udjel mliječne masti i pojačana kiselost, kao i karakterističan okus, miris, boja i konzistencija (Markov i sur., 2009).

2.2. PROIZVODNJA SVJEŽEG SIRA

U tehnološkom procesu proizvodnje svježeg sira posebnu je pozornost potrebno obratiti na odabir mlijeka. Mlijeko mora biti odgovarajućih kemijskih i senzorskih svojstava te mikrobiološki ispravno. Također treba imati očuvana prirodna svojstva kazeina te treba biti osigurana dovoljna količina topljivog kalcija (Tratnik i Božanić, 2012). Odnos između mliječnih komponenata predstavlja složeni sustav koji određuje svojstva koagulacije mlijeka (Aleandri, 1989).

Nakon odabira mlijeko se centrifugira i pasterizira. Toplinski se obrađuje kako bi se spriječila zaraza potrošača patogenim bakterijama, ali i da bi se osigurala odgovarajuća mikrobiološka kvaliteta koja uvjetuje trajnost krajnjeg proizvoda. Jedino se kod proizvodnje svježeg sira mlijeko može obraditi pri višim temperaturama i dulje vrijeme, što dovodi do međudjelovanja kazeina i proteina sirutke (Tratnik i Božanić, 2012). Toplinskom obradom neće se uništiti sporogene bakterije pa se u današnje vrijeme prije same toplinske obrade može primjeniti i kombinirani APV-sustav mikrofiltracije. Time ne dolazi do gubitka proteina, a postiže seveći prinos sir, veća trajnost i kvaliteta dobivenog proizvoda (Tratnik i Božanić, 2012).

Ovisno o željenom udjelu masti u suhoj tvari sira, mlijeko za podsiravanje standardizira se na određen udio mliječne masti. Svježi sir može sadržavati različite udjele masti u suhoj tvari, a proizvodi se koagulacijom mlijeka zakiseljavanjem pomoću bakterija mliječne kiseline s ili bez dodatka manjih količina sirila (Kubat i sur., 2015). Prilagođavanje udjela masti može se provesti i nakon odvajanje sirutke i to najčešće iznosi 0,5-1% masti u odnosu na suhu tvar. Nakon pripreme mlijeka za podsiravanje slijedi zakiseljavanje i grušanje mlijeka.

Svježi se sirevi proizvode mliječno-kiselom fermentacijom pomoću bakterija mliječne kiseline (Božanić, 2015). Prema načinu koagulacije proteina svježi sirevi mogu se podijeliti na one dobivene isključivo koagulacijom kiselinama, koagulacijom kombinacije kiseline i sirila i svježe sireve proizvedene djelovanjem sirila. U industrijskoj se proizvodnji najčešće upotrebljava kombinacija kiselina i sirila kako bi se postigla bolja čvrstoća sira. Najčešće se koriste mješovite kulture sastavljene od sojeva proizvođača kiseline i sojeva proizvođača tvari arome. Kod proizvodnje sireva uz dodatak mezofilne kulture, mlijeku temperature 30°C doda se starter kultura te ovisno o načinu proizvodnje može se dodati sirilo. Sirenje mlijeka zatim se provodi pri u tradicionalnim otvorenim kadama ili bazenima. Kako bi pospješili izdvajanje sirutke nakon

postizanja odgovarajuće kiselosti (najčešće izoelektrična točka kazeina (pH 4,9-4,6), gruš se reže na veće komadiće. Što je gruš sitniji, veća je reaktivna površina sirnog zrna i veći je gubitak masti (Havranek i sur., 2014). Brže stiskanje veće površine uzrokovat će jače istiskivanje sirutke pa će takvi sirevi imati manji udio vlage. Nakon rezanja gruš slijedi odvođenje sirutke i njegovo prešanje. Gruš se preša toliko dugo dok se ne izdvoji dovoljna količina sirutke i ne postigne traženi udio suhe tvari.

Kod sireva koji se proizvode isključivo djelovanjem bakterija mliječne kiseline odnosno kiselinskom koagulacijom, izdvajanje i odvođenje sirutke pospješuje se zagrijavanjem gruš na temperaturi do 38°C. Ukoliko je svježi sir proizveden na kontinuirani način uz primjenu centrifuga s integriranim sustavima za miješanje najprije se proizvede posni svježi sir, a zatim se dodaje vrhnje u svrhu prilagođavanja odgovarajućeg udjela masti u suhoj tvari sira. Ovisno o načinu proizvodnje, svježi sir može biti mrvičast do zrnat, kao i maziv i kremast. Glatka i kremasta konzistencija može se postići homogenizacijom sira koja podrazumijeva primjenu pumpe i sita (Kubat i sur., 2015). Svježi zrnati sir proizvodi se od obranog mlijeka. Gruš se reže na male kockice i postepeno zagrijava na temperaturu i do 60°C kako bi svaka sirna kockica postigla odgovarajuću čvrstoću. Budući da se zrnati sir radi od obranog mlijeka i ima prilično neutralan okus, prije pakiranja on se prelijeva kremastom mješavinom vrhnja (Turić, 2017). Zajednička karakteristika svih ovih sireva je da ne prolaze kroz fazu zrenja, već su nakon proizvodnje i pakiranja koje je najčešće u plastičnu ambalažu spremni za konzumiranje.

2.3. MIKROBNE KULTURE U PROIZVODNJI SVJEŽEG SIRA

Jedan od najvažnijih koraka u proizvodnji sira je provedba koagulacije proteina tj. sirenje ili grušanje mlijeka i oblikovanje koaguluma ili sirnog gruša uz izdvajanje određene količine sirutke koji se provodi uz dodatak mikrobnih kultura (Tratnik i Božanić, 2012). Mikrobne kulture mogu se definirati kao pažljivo selekcionirani mikroorganizmi koji se dodaju u mlijeko ili grušu zbog iniciranja i izvođenja poželjne fermentacije i zrenja u proizvodnji različitih tipova sira, ali i fermentiranih mlijeka (Matijević, 2015). Primarna uloga mikrobne kulture je acidifikacija gruša u sirarskom kotlu i postizanje konačne pH vrijednosti, a sekundarna uloga očituje se tijekom zrenja, posebice tijekom proteolize kao važnog čimbenika u razvoju okusa sira (Radeljević i sur., 2013). Mikroflora sira može biti podijeljena u dvije grupe: starter kulture i sekundarna mikroflora. U industrijskoj se proizvodnji starter kultura dodaje naknadno u mlijeko te je zaslužna za razvoj kiseline tijekom proizvodnje sira (de Fátima Poças i Pintado, 2010). Mikrobne kulture možemo podijeliti prema optimalnoj temperaturi rasta i konačnim produktima fermentacije. Prema optimalnoj temperaturi rasta mikrobne kulture dijelimo na mezofilne ili termofilne kulture bakterija mliječne kiseline. Prema konačnim produktima fermentacije bakterije dijelimo na homofermentativne i heterotrofne. Konačan produkt homofermentativnih bakterija je mliječna kiselina, dok su konačni produkti heterotrofnih bakterija mliječna kiselina i drugi metaboliti poput etanola i CO₂. Tijekom proizvodnje sira broj bakterija poraste s početnih 10⁵ do 10⁷ cfu mL⁻¹ (eng. Colony Forming Units - cfu), ovisno o vrsti sira do 10⁹ cfu mL⁻¹ već u par sati (Cogan, 2011). Mezofilne kulture koje se najčešće koriste pripadaju rodu *Lactococcus* i ponekad *Leuconostoc*, dok se od termofilnih kultura najčešće upotrebljavaju *Streptococcus thermophilus* i termofilne *Lactobacillus* vrste (Cogan, 2011).

2.3.1. MEZOFILNE KULTURE

Mezofilne kulture podijeljene su u LD kulture i O kulture. LD kulture sadrže Cit⁺ bakterije mliječne kiseline (L = *Leuconostoc* vrste i D = *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*) (Bockelmann, 2010). Osim mliječne kiseline, produkti fermentacije kod LD bakterije su plin CO₂ te znatno utječu na nastanak tvari arome. LD bakterije spadaju u grupu

heterofermentativnih bakterija mliječne kiseline čiji su konačni produkti mliječna kiselina, plin CO₂ te etanol te su ujedno i zaslužne za nastanak tvari arome. U proizvodnji svježeg sira najčešće se koriste O kulture. Njihov je konačan produkt mliječna kiselina. U O kulture spadaju *Lactococcus lactis subsp. lactis* i *Lactococcus lactis subsp. cremoris*.

Optimalna temperatura rasta mezofilnih kultura bakterija mliječne kiseline je od 25 do 30°C. Kod temperatura ispod 20 proizvodnja kiseline je usporena ili u potpunosti odsutna, dok je iznad temperature od 39°C inhibiran rast bakterija.

Tablica 2. Glavne značajke pojedinih vrsta bakterija mliječne kiseline (Tratnik i Božanić, 2012)

Bakterije mliječne kiseline	Optimalni rast/ °C	Vrenje šećera			Tvorba laktata/%	Vrenje citrata	Podnose soli/%	Proteolitička aktivnost
		Lak	Glu	Gal				
<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	oko 30	+	+	+	L/0,5-0,7	+/-	4-6,5	+
<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	25-30	+	+	+	L/0,5-0,7	-	2-4,0	+
<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i>	oko 30	+	+	+	L/0,5-0,7	+	4-6,5	+

Lak= laktoza, glu=Glukoza, Gal= galaktoza, Lac.= *Lactococcus*

L= L(+)-laktat, D=D(-)-laktat (optički aktivni izomerni oblici laktata);

Primarni produkt koji nastaje djelovanjem starter kultura je mliječna kiselina koja uzorkuje brzo zakiseljavanje mlijeka te je odgovorna i za nastanak tvari arome. Bakterije mliječne kiseline koje zauzimaju središnju ulogu u procesu fermentacije imaju dugu i sigurnu povijest primjene i potrošnje. Međutim, djelovanjem starter kultura oslobađaju se i drugi sekundarni metaboliti kao što su octena kiselina, etanol, aromatski, bakteriocini, egzopolisaharidi i enzimi što je velike važnosti za ubrzavanje i upravljanje fermentacijskim procesom (Hati i sur., 2013). Octena kiselina

osim što pridonosi nastanku arome ima značajnu ulogu i u prevenciji rasta plijesni. S druge strane bakteriocini i bioaktivni peptidi imaju specifičan baktericidni učinak na uzročnike kvarenje sira, osobito patogena kao što su *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus* i *Listeria monocytogenes*. Kod proizvodnje svježeg sira najčešće se uz mezofilnu kulturu dodaju i proteolitički enzimi kako bi se poboljšala struktura gruša i olakšalo otpuštanje sirutke (Tratnik i Božanić, 2012).

2.3.2. PROTEKTIVNE KULTURE

U današnje vrijeme kada oboljenja izazvana hranom predstavljaju veliki problem, proizvođači hrane uz kontrole zdravstvene i higijenske ispravnosti uvode nove načine proizvodnje prehrambenih proizvoda kako bi im se produžio rok trajanja i osigurala zdravstvena ispravnost. Protektivne bi se kulture najprije trebale smatrati kao dodatan faktor sigurnosti, kojim bi se poboljšala mikrobiološka sigurnost hrane. Njihova bi implementacija trebala slijediti dobru proizvođačku praksu, kako bi se smanjio rizik od rasta i preživljavanja patogenih organizama i organizama kvarenja (Holzapfel i sur., 1995). Kako bi se mogle staviti na tržište, protektivne kulture moraju zadovoljiti neke kriterije kao sigurnost za zdravlje potrošača na način da ne produciraju toksine ili da nisu patogene, pozitivan utjecaj na proizvod putem kompetitivnosti s patogenim mikroorganizmima te da nemaju negativnih učinaka na senzorska svojstva proizvoda. Kao proizvod metaboličke aktivnosti ovih bakterija stvaraju se različite tvari koje aktivnom supresijom rasta patogenih mikroorganizama uzročnika kvarenja hrane doprinose poboljšanju trajnosti fermentiranih proizvoda (Dimitrijević-Branković, 2003). U tablici 3. prikazana su antimikrobna svojstva brojnih metabolita bakterija mliječne kiseline. Protektivne kulture *Lactobacillus plantarum* koristi se za rast kontrole bakterija roda *Leuconostoc*, heteofermentativnih laktobacila, Enterokoka te pritom ima minimalan utjecaj na senzorska svojstva. Kombinacija protektivnih kultura *Lactobacillus rhamnosus* LC705 i *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* JS smatra se kao najučinkovitijim agensom protiv kvasaca plijesni i bakterije *Bacillus* spp. (Suomalainen i Mäyrä-Mäkinen, 1999).

Tablica 3. Metabolički produkti bakterija mliječne kiseline s antimikrobnim svojstvima (Holzapfel i sur., 1995)

Produkt	Glavni ciljani organizam
<p>Organska kiselina</p> <ul style="list-style-type: none"> • mliječna kiselina • octena kiselina 	<ul style="list-style-type: none"> • Gram negativne bakterije, neke gljive • <i>Clostridium spp</i>, neki kvasci i gljive
Vodikov peroksid	Patogeni mikroorganizmi i mikroorganizmi kvarenja, posebno u hrani bogatoj proteinima
<p>Enzimi</p> <ul style="list-style-type: none"> • laktoperoksidaza • lizozim 	<ul style="list-style-type: none"> • Patogene bakterije i bakterije kvarenja • Neželjene gram-pozitivne bakterije
<p>Nisko molekularni metaboliti</p> <ul style="list-style-type: none"> • Reuterin • Diacetil • Masne kiseline 	<ul style="list-style-type: none"> • Širok spektar bakterija, plijesni i kvasaca • Gram-negativne bakterije • Različite bakterije
<p>Bakteriocini</p> <ul style="list-style-type: none"> • nizin 	<ul style="list-style-type: none"> • neke bakterije mliječne kiseline i gram-pozitivne bakterije

2.4. ČIMBENICI KVARENJA SVJEŽEG SIRA

Čimbenici koji najčešće utječu na kvarenje svježeg sira su (Havranek i sur., 2014):

- Nečisto i nakiselo mlijeko uvjetovano nehigijenskim uvjetima dobivanja te čuvanje mlijeka na visokim temperaturama, osobito tijekom ljetnih mjeseci
- Neodgovarajuća hranidba muzara hranjenih gorkom, pljesnivom trulom i starom krmom, silažom onečišćenom zemljom, vlažnim djetelinskim sijenom, vlažnim repinim rezancima i drugim krmivima koje nepovoljno utječu na kvalitetu mlijeka od kojeg se proizvodi sir s izraženim pogreškama
- Nečisto posuđe, uređaji i prostorije za proizvodnju, čuvanje, zaprimanje i rukovanje mlijekom kao stalni izvor kontaminacije mlijeka, a poslije i sira
- Propusti u tehnološkom procesu podsiravanja mlijeka, sušenja sirnog zrna koji se očituju različitim intenzitetom na gotovom siru (mekan, nedovoljno slan sir izložen previsokoj temperaturi može se naduti, razmekšati, raspucati uz nastajanje neugodnog mirisa, dok se presuh i presoljen sir mrvi)
- Sirila neodgovarajuće kvalitete (pohranjena u neodgovarajućim uvjetima ili kojima je istekao rok uporabe mogu uzrokovati nadimanje i gnjiljenje sira)

2.4.1. Mikrobiološki čimbenici kvarenja

Iako se sirevi smatraju sigurnom i teško kvarljivom hranom, svježi sirevi lako su podložni kontaminaciji. Kako bi se očuvala zdravstvena ispravnost sira potrebno je pozornost obratiti na kvalitetu mlijeka, dodane starter ili prirodno prisutne bakterije rasta mliječne kiseline, pH, kontrolu zrenja i kemijskih promjena koje se javljaju u siru tijekom zrenja. Patogeni koji se prenose iz sirovog mlijeka potječu iz poljoprivrednog okoliša ili izravnog izlučivanja iz zaraženih vimenâ životinja, dok u mliječnim proizvodima patogeni mogu ući putem kontaminiranog mlijeka. Važan izvor kontaminacije tijekom rukovanja i prerade mlijeka može biti i radnik (Kousta i sur., 2010). Ministarstvo poljoprivrede (Vodič, 2011) dalo je pregled preporučenih mikrobioloških kriterija za svježi

sir (Tablica 4), dok su Zakonom o higijeni hrane i mikrobiološkim kriterijima za hranu (NN 81/13) utvrđeni zakonski kriteriji za zdravstvenu ispravnost sireva.

Tablica 4. Pregled preporučenih mikrobioloških kriterija za svježi sir (Vodič, 2011)

3.5.2.	Hrana	Preporučeni parametri	Plan uzrokovanja		Kriteriji
			n	c	
	Meki (svježi) sirevi od pasteriziranog mlijeka	<i>Salmonella</i> spp.	5	0	$M=0\text{cfu (25g)}^{-1}$
		<i>Escherichia coli</i>	5	2	$m=10\text{cfu (g)}^{-1}$ $M=10^2 \text{ cfu (g)}^{-1}$
		Koaagulaza pozitivni stafilokoki/ <i>Staphylococcus aureus</i>	5	2	$m=10\text{cfu (g)}^{-1}$ $M=10^2 \text{ cfu (g)}^{-1}$
		<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	$M=0 \text{ cfu (25g)}^{-1}$
		Kvasci	5	1	$m=10^2\text{cfu (g)}^{-1}$ $M=10^3 \text{ cfu (g)}^{-1}$
		Plijesni	5	1	$m=10\text{cfu (g)}^{-1}$ $M=10^2 \text{ cfu (g)}^{-1}$

*n-broj elementarnih jedinica uzorka koji čine uzorak

*c- broj jedinica uzorka, gdje se broj bakterija može nalaziti između "m" i "M", pri čemu se uzorak smatra prihvatljivim, ukoliko je broj bakterija u ostalim jedinicama uzoraka "m" ili manje od "m"

*m-granična vrijednost ispod koje se svi rezultati smatraju zadovoljavajućim

*M- granična dopuštena vrijednost iznad koje se rezultati smatraju ne zadovoljavajućim.

Udovoljavanje ovim mikrobiološkim kriterijima ovisi o nizu čimbenika: sirovini, odnosno o mlijeku i načinima njegova dobivanja, o tehnološkom procesu proizvodnje, tehnološkim uvjetima i izvedbi proizvodnih pogona, te o uvjetima čuvanja proizvoda na mjestu proizvodnje, u vlastitom domaćinstvu potrošača i na tržištu (Hrvatska agencija za hranu, 2016).

Upotrebom protektivnih kultura mogu se stvoriti dodatne barijere kako bi se inhibirao rast patogenih bakterija (Fox i sur., 2004). Kod proizvodnje svježeg sira obično se primjenjuje i toplinska obrada mlijeka koja se koristi za uništavanje mikroorganizama. Toplinska obrada mlijeka treba zadovoljiti dva osnovna uvjeta: maksimalno očuvati njegova organoleptička i prehrambena svojstva mlijeka te postići potreban letalni učinak s ciljem uništenja i inaktivacije mikroorganizama kako bi se u konačnici postigla odgovarajuća trajnost proizvoda. Patogeni mikroorganizmi kao što su *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* i *E. coli* predstavljaju najveći rizik za sigurnost svježeg sira. Ukoliko se kod proizvodnje sira koriste aktivne starter kulture bakterija mliječne kiseline, smatra se da je rizik od patogena *Staphylococcus aureus* malen (Johnson i sur., 1990).

Patogeni otporni na visoke koncentracije soli i suhu okolinu predstavljaju najveću opasnost po sigurnost svježih sireva (Kousta i sur., 2010; Verraes i sur., 2015), otkriveni su u slanoj vodi, sirnim maramama, sirnim kadama, prostorijama za proizvodnju, te noževima za rezanje i materijalima za pakiranje (Brito i sur., 2008; Callon i sur., 2008. Temelli i sur., 2006). Mikroorganizmi koji najčešće uzrokuju intoksikacije prilikom konzumacije sira, su *Bacillus spp.*, *Clostridium botulinum* i *Staphylococcus sp.* (Fox i sur., 2004). Činjenica koja osobito zabrinjava je da su u proteklih nekoliko godina gram pozitivne (*L. Monocytogenes*) i negativne bakterije poput *S. typhimurium* i *E. coli*, povećale otpornost na kiselinu te koncentraciju kisika te tako uspjevaju preživjeti u kiseloj i fermentiranoj hrani (Fox i sur., 2004).

Kvasci i plijesni

Kvasci i plijesni spadaju u organizme koji lako rastu u širokom spektru hrane te uzrokuju njezino kvarenje. Kvasci se prirodno pojavljuju u mnogim sirevima budući da niski pH, relativno visok sadržaj vlage i temperatura skladištenja pogoduju rastu kvasca, a broj stanica na površini sira može doseći 10^5 - 10^8 cfu g⁻¹ (Fleet, 1990). Kvasci su važni u deacidifikaciji i stvaranju metabolita kao što su etanol, acetaldehid i CO₂, no s druge strane mogu uzrokovati kvarenje. Tako su mane poput voćnog i gorkog okusa, mirisna i otvorena tekstura pripisane aktivnostima kvasca (Fox i sur., 2004). Kao i kvasci, plijesni su također osjetljive na toplinsku obradu pa se lako uništavaju pasteurizacijom. Svim je mikroorganizmima za rast potrebna voda te ukoliko nisu pakirani u vakuumu brzo dolazi do sušenja površine sira što ujedno usporava i rast mikroorganizama. Aktivitet vode potreban za rast bakterija iznosi <0,92, dok za kvasce iznosi 0,83, a plijesni 0,75. Ukoliko mikroorganizmi provedu duže vrijeme u lag fazi onda je moguć rast i pri nižim vrijednostima a_w . Što se tiče pH vrijednosti većina bakterija za rast treba neutralan pH te je pri nižim pH vrijednostima njihov rast usporen. pH sirnog gruš nakon proizvodnje najčešće je između 4,5-5,3 pa je stoga on značajan faktor u kontroli rasta bakterija (Cognan, 2011).

Enterobakterije

Enterobacteriaceae (enterobakterije) ili crijevne bakterije normalna su mikroflora probavnog sustava u ljudi i životinja. Prisutnost enterobakterija u namirnicama indikator je nedovoljne higijene tijekom proizvodnje, čuvanja i rukovanja namirnicama. Obitelj *Enterobacteriaceae* obuhvaća rodove *Salmonella* (patogen), *Escherichia* (potencijalni patogen), *Shigella* (patogen), *Klebsiella*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Yersinia*, *Hafnia*, *Serratia*, *Edwardsiella* i *Erwinia*. Patogenost enterobakterija uzrokovana je endotoksinima, egzotoksinima i mogućnošću da nadvlada obranu domaćina i da se razmnožava u krvi i tkivima (Panday i sur., 1999).

Eschericia coli

Najpatogeniji soj *E. coli* koji je zasad poznat je *E. coli* O157:H7, koji izaziva hemolitički uremički sindrom (Markov i sur., 2009). Prisutnost ovog soja u hrani posljedica je kontaminacije sirovina poput mesa, mlijeka, voća i povrća (Bardasi i sur., 2015).

Staphylococcus aureus

S. aureus je gram-pozitivna, fakultativno anaerobna bakterija čiji je optimalan rast na temperaturi od 37 °C i u mediju pH vrijednosti između 4 - 10. Smatra se najopasnijim ljudskim patogenim koji uzrokuje širok raspon kliničkih infekcija, te ima sposobnost stvaranja enterotoksina. Velik broj sojeva *S. aureus* sposoban je stvarati ekstracelularne termostabilne enterotoksine, koji svoju biološku aktivnost zadržavaju i nakon toplinske obrade mlijeka i/ili sirnog gruša (Walstra i sur., 1999.). Prisutnost vrste *S. aureus* u više od 90 % povezana je pojavom kliničkog i supkliničkog mastitisa muznih životinja (Markov i sur., 2009) te do kontaminacije sira najčešće dolazi zbog infekcije vimena.

Lysteria monocytogenes

L. monocytogenes je gram pozitivna bakterija, patogena bakterija koja uzrokuje grupu bolesti nazvanu listerioza. Postotak smrtnosti nakon trovanja *L.monocytogenes* je velik i iznosi 30% (NACMCF, 1991). *L. monocytogenes* može dospjeti u hranu preko zemlje ili vode, te se putem životinja prenosi na mesne i mliječne proizvode. Značajna karakteristika ove bakterije je da raste i na temperaturu hladnog skladištenja (+4°C) se često može naći u velikom broju prehrambenih proizvoda, iako su oni propisno čuvani na niskim temperaturama. Najmanja infektivna doza *L. monocytogenes* za ljude je nepoznata, no podaci sakupljeni nakon nekoliko većih epidemija listerioze upućuju na vrijednosti od 10^7 do 10^{11} cfu g⁻¹ namirnice (Dalton i sur., 1997). Međutim, razvoj bolesti moguć je i nakon unosa nižih doza (Ooi i Lorber, 2005).

2.4.2. Ostali čimbenici kvarenja

Zbog visokog sadržaja vlage, niske koncentracije soli i visokog pH, svježi sirevi su podložni kvarenju i stoga imaju ograničen rok trajanja. Lako dolazi do dehidracije te stoga pakiranje treba imati zaštitnu barijeru. Povrh toga utjecaj svjetla i kisika može rezultirati u pogoršanju kvalitete (de Fátima Poças i Pintado, 2010). Zbog pakiranja sira u transparentnu ambalažu često dolazi do foto oksidacije što uzrokuje promjene u boji sira. Oksidativna užeglost mliječne masti

siru može biti uzrok vrlo lošeg okusa i mirisa sira dok oksidativne promjene lecitina dovode do oslobađanja trimetilamina pa sir ima okus i miris na ribe (Tratnik i Božanić, 2012). Gorak okus sira može biti uzrokovan dodatkom veće količine sirila. Osim toga gorak okus sira može biti i posljedica gorkog okusa mlijeka uzrokovanog krmivom koje sadrži velike količine pelina, repice, žabnjaka i slično. Kiseo okus sira najčešće potječe od preduge obrade sirnog zrna i prevelike količine sirutke zaostale u mlijeku (Havranek i sur., 2014). Na teksturu sira utječu sadržaj vlage u siru, udio masnoće i udio masnoće u suhoj tvari sira (de Fátima Poças i Pintado, 2010). Tijekom skladištenja svježeg sira dolazi do promjene u vezanju vode unutar gruša te do gubitka vode zbog evaporacije vode sa površine sira što rezultira mrvljivim i drobljivim tijestom (McSweeney, 2007). Krto i drobljivo tijesto može uzrokovati i nakiselo mlijeko.

2.5. Karakteristike i senzorska svojstva svježeg sira

Senzorska (organoleptička) analiza je znanstvena disciplina koja se koristi u svrhu mjerenja, analize i interpretacije reakcija na karakteristična svojstva namirnica koja se određuju uz pomoć osjetila mirisa, okusa, dodira i sluha (Božanić i sur., 2010). Prednost je ove metode da se na brzi način mogu detektirati mane proizvoda no ne osigurava u potpunosti objektivnost te se iz tog razloga pokušavaju odabrati druge, objektivnije analize. Kod senzorske analize sireva najčešće se ocjenjuju okus, miris, tekstura i naknadni okus u ustima te izgled kore odnosno površine.

Tipičan svježi sir karakterističnog je srednje kiselog, osvježavajućeg okusa, bijele je boje i konzistencije koja se «lista». pH vrijednost svježeg sira iznosi oko 4,8 te je blizu izoelektrične točke kazeina, što konačnom proizvodu daje prepoznatljivu kiselost koja se odražava ne samo u okusu, već i u mirisu (Cindrić, 1997). Svježi sir je spreman za konzumaciju odmah nakon završnog cijedenja gruša. Svježi sir sadrži visok udjel vlage (oko 55%) i karakterizira ga time visoka vrijednost aktiviteta vode a_w (0,95-0,97), te za razliku od ostalih vrsta sireva ne zrije već se čuva na temperaturi hladnjaka.

Prema klasifikaciji vrste sira obzirom na udio mliječne masti u suhoj tvari sira udio masti u posnom siru je manji od 10%. Sirevi s većim udjelom masti sadržavaju nešto manje proteina pa i nešto

manju količinu Ca i P (Tratnik i Božanić, 2012). Najveći udio proteina u svježem siru čini kazeinjer su proteini sirutke neosjetljivi su na djelovanje kiseline ili enzima, pa se pri proizvodnji sira, nakon odvajanja koaguliranog kazeina, gube sa sirutkom (Tratnik, 1998).

Tablica 5. Vrste sira s obzirom na udio mliječne masti u suhoj tvari sira (Pravilnik, 2013)

Vrsta sira obzirom na udio mliječne masti u suhoj tvari	Udio mliječne masti u suhoj tvari (%)
Ekstra masni	≥ 60
Punomasni	≥ 45 i < 60
Masni	≥ 25 i < 45
Polumasni	≥ 10 i < 25
Posni	< 10

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

Za proizvodnju sira korišteno je mlijeko kupljeno od obiteljskog poljoprivrednog gospodarstva Šmida (OPG Šmida, Vrbovec). Mlijeko je podsireno uz pomoć kultura Probat 222, CHOOZIT BT01 i CHOOZIT MA11 (sve Du-Pont, Danisco, Francuska). U drugoj seriji pokusa uz prethodno navedene mezofilne kulture korišteno je i sirilo (Medimon d.o.o, Split, Hrvatska). U zadnjoj seriji pokusa izabrao se sir koji ima najdužu trajnost i ponovio postupak proizvodnje, ali na način da se dodala protektivna kultura Holdbac YM-C Plus (Du-Pont, Danisco, Francuska) prema uputi proizvođača.

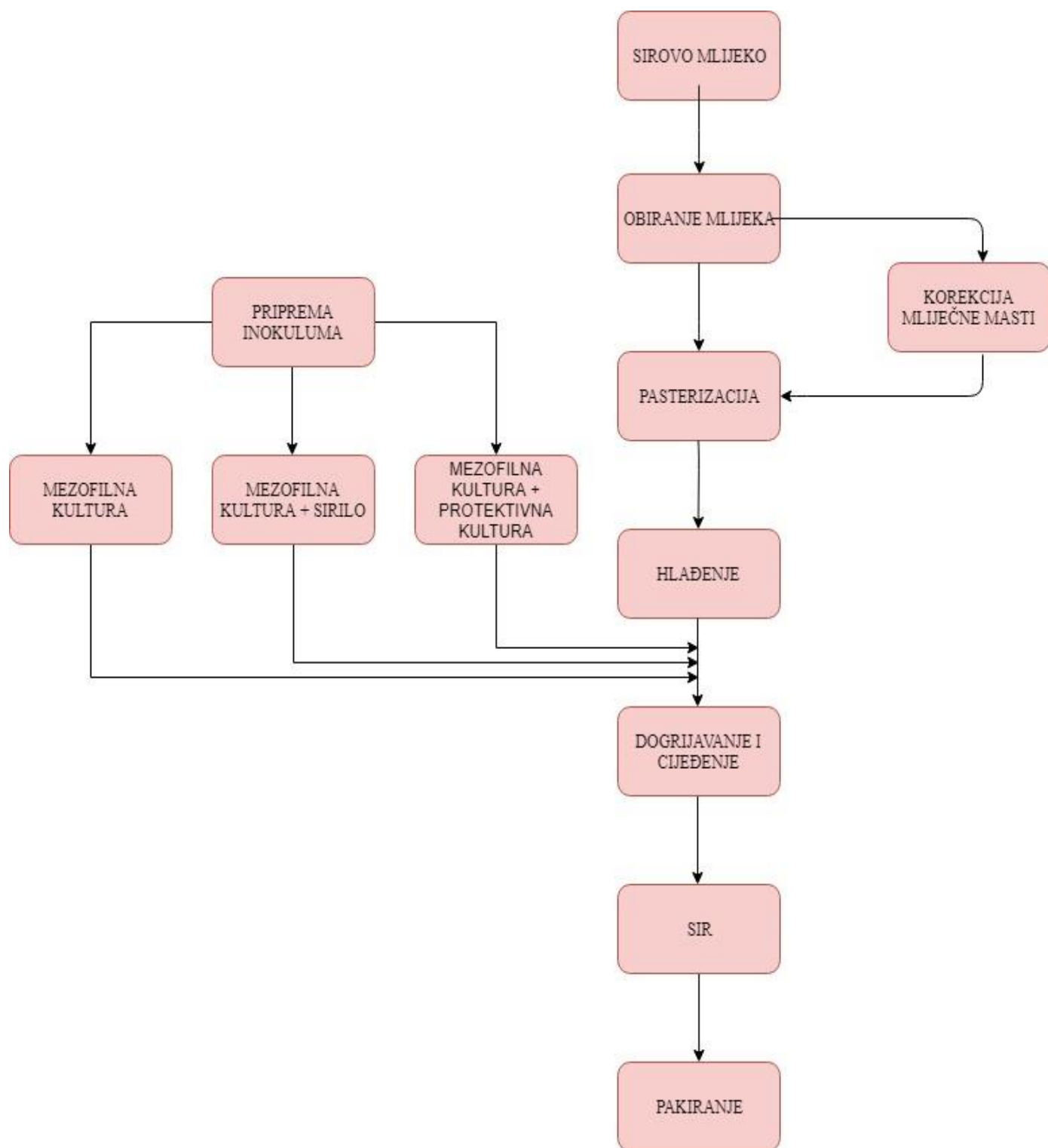
Kulture su se sastojale od slijedećih sojeva:

- Probat 222: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* i *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*
- CHOOZIT MA11: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*
- CHOOZIT BT01: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* i *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*.
- Holdbac YM-C Plus: *Lactobacillus rhamnosus* i *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*

3.2. METODE

Kako bi se ispitao utjecaj starter kulture na svojstva svježeg sira, provedena su 3 načina proizvodnje sira:

1. Proizvodnja serije sireva br.1- fermentacija mlijeka dodatkom isključivo mezofilne kulture (Probat 222, CHOOZIT BT01, CHOOZIT MA11) pri čemu su u jednom pokusu proizvedena 3 uzorka sira.
2. Proizvodnja serije sireva br. 2- fermentacija mlijeka dodatkom mezofilne kulture (Probat 222, CHOOZIT BT01, CHOOZIT MA11) i sirila pri čemu su u jednom pokusu proizvedena 3 uzorka sira.
3. Proizvodnja serije sireva br. 3.- način proizvodnje (serija 1 ili 2) u kojem je sir imao veću trajnost, tako da se ponovno proizvede sir na taj način, ali da se njemu još doda protektivna kultura Holdbac YM-C Plus LYO 100 DCU u količini.



Slika 1. Shema proizvodnje svježeg sira

3.2.1. Proizvodnja sira

3.2.1.1. Proizvodnja sira mezofilnom kulturom

U prvoj seriji pokusa korištene su samo mezofilne kulture. Sirovo je mlijeko najprije zagrijano na 20°C, te je dio uzorka izuzet za određivanje mliječne masti. Mlijeko se zatim nastavilo zagrijavati do 50°C te se obralo. Nakon obiranja odredio se udio mliječne masti te ukoliko je on bio zadovoljavajući (ispod 1%) mlijeko se pasteuriziralo na 85-90°C, tijekom 10 minuta. Pasteriziranom mlijeku odmah se odredila mikrobiološka kvaliteta, udio mliječne masti te se mali dio uzorka zamrznuo za određivanje mineralnih tvari. Pasterizirano mlijeko se zatim podijelilo u 3 dijela tako da je volumen svakog iznosio 2 L, a nakon toga je uslijedilo hlađenje na oko 30°C. Svaki od dijelova podisirio se dodatkom slijedećih kultura:

1. Kultura 1 -Choozit MA 11 LYO 25 DCU
Dodatak 0,02 g na 2 L mlijeka.
2. Kultura 2- Choozit BT 01 LYO 50 DCU
Dodatak 0,0168 g na 2 L mlijeka.
3. Kultura 3- Proobat 222 LYO 100 DCU
Dodatak 0,018 g na 2 L mlijeka.

Inokuliranom mlijeku je izmjerena pH vrijednost te je stavljeno na podsiravanje na temperaturu od 30°C te se pratilo trajanje fermentacije do postizanja pH 4.6. Fermentirano se mlijeko izrezalo na kockice te se zatim dogrijavalo na temperaturi od 60°C kako bi se dobio sirni gruš.

Sir se zatim stavio u hladnjak da se ocijedi te se po završetku postupka izmjerila količina sirutke i udio dobivenog sira radi izračuna prinosa. Sir se zatim raspodijelio na 5 jednakih dijelova, te se zapakirao u platične vrećice pomoću varilice. Sir se čuvao ukupno 21 dan, od čega su se uzrokovanja radila 1., 4., 9., 14. i 21. dan.



Slika 2. Prikaz svježeg sira (vlastita fotografija)

Kriteriji za završetak praćenja trajnosti bili su: mikrobiološki parametri (kvasci i plijesni $> 10^3$ cfu g⁻¹, koagulaza pozitivni stafilokoki $> 10^2$ cfu g⁻¹ i enterobakterije $> 10^2$ cfu g⁻¹), znatno promijenjena senzorska svojstva te neodgovarajuća boja i tekstura.

Odmah nakon primitka u svježem sirovom mlijeku analizirani su:

1. pH
2. SH
3. Udio mliječne masti Gerber
4. Udio proteina- Kjeltec
5. % s.t. i % pepela
6. Mikrobiološka analiza

U pasteriziranom mlijeku odmah je analizirano:

1. Mikrobiološka analiza
2. Udio mliječne masti
3. Mala količina uzorka se sačuvala za određivanje mineralnog sastava na HVI-u

Svim proizvedenim uzorcima sireva određivalo se:

1. Aktivna kisleost (pH)
2. Titracijska kisleost ($^{\circ}\text{SH}$)
3. Mikrobiološka analiza
4. Tekstura i boja
5. Senzorska analiza
6. Udio suhe tvari

Prvi je dan sirevima određen i:

1. Udio mliječne masti
2. Mineralne tvari
3. Udio proteina
4. Udio suhe tvari

3.2.1.2. Proizvodnja 2. serije sira

Kod druge proizvodnje sira mezofilnom kulturom i sirilom ponovljeni je postupak proizvodnje sira kao kod proizvodnje broj 1, ali je uz dodatak kulture istovremeno dodano sirilo u količini 2 mL sirila na 2 litre mlijeka.

3.2.1.3.. Proizvodnja 3. serije sira

Za proizvodnju 3. serije sira odabran je proizvod u kojem je sir imao veću trajnost (serija 1 ili 2) uz isti postupak proizvodnje kao i kod 1. i 2. serije sira, uz razliku da se doda još protektivna kultura Holdbay YM-C Plus LYO u količini 100 DCU.

Oznake uzoraka:

Oznakom BT01 označen je sir proizveden uz pomoć mezofilne kulture CHOOZIT BT01.

Oznakom MA11 označen je sir proizveden uz pomoć mezofilne kulture CHOOZIT MA11

Oznakom PRO 222 označen je sir proizveden uz pomoć mezofilne kulture Probat 222.

Oznakom BT01+s označen je sir proizveden uz pomoć mezofilne kulture CHOOZIT BT01 i sirila.

Oznakom MA11+s označen je sir proizveden uz pomoć mezofilne kulture CHOOZIT MA11 i sirila

Oznakom PRO 222+s označen je sir proizveden iz pomoć mezofilne kulture Probat 222 i sirila.

Oznakom MA11-k j označen je sir proizveden uz pomoć mezofilne kulturekoji je služio kao kontrolni uzorak siru proizvedenom od mezofilne kulture CHOMA11 i protektivne kulture.

Oznakom MA11+p označen je sir proizveden uz pomoć mezofilne kulture CHOMA11 i protektivne kulture.

3.2.2. Određivanje udjela suhe tvari u mlijeku i siru

3.2.2.1. Direktna metoda za određivanje ukupne suhe tvari

Potreban pribor i reagensi:

- Analitička vaga
- Eksikator s učinkovitim sredstvom za izvlačenje vlage
- Posudice s ravnim dnom, visine 20 do 25 mm, promjera 50 do 75 mm, od odgovarajućeg materijala, s poklopcima koji dobro prijanjaju i lako se uklanjaju (obično Al-posudice)
- Hvataljka za posudice
- Sušionik s temperaturom održavanom na $102 \pm 2^{\circ}\text{C}$ na cijelom radnom prostoru
- Kvarcni pijesak, Grammol, Zagreb

Metoda se temelji na isparavanju vode iz uzorka za analizu sušenjem u sušioniku pri konstantnoj temperaturi od $102 \pm 2^{\circ}\text{C}$ do konstantne mase. U prethodno posušenu, ohlađenu i odvagnutu aluminijsku posudicu napunjenu izarenim pijeskom s točnošću 0,0001 g odvagne se 2-3 g uzorka sira, odnosno 10 mL mlijeka. Posudica se potom stavi u sušionik i suši 1-2 sata pri $102 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Potom se posudica izvadi iz sušionika u eksikator, ohladi i izvaže na analitičkoj vagi. Sušenje se ponavlja tako dugo dok se u dvije uzastopne odvage ne postigne razlika manja od 1 mg (Božanić i sur., 2010).

Potom se vrši izračun udjela suhe tvari prema formuli:

$$\frac{\text{zadnja odvaga} - \text{prazna posudica}}{\text{odvaga uzorka}} \times 100 = \% \text{ suhe tvari}$$

3.2.3. Određivanje udjela proteina u mlijeku i siru modificiranom metodom po Kjeldahlu-referentna metoda

Potreban pribor i kemikalije:

- Analitička vaga
- Aluminijska folija
- Kiveta
- Pipeta od 25 mL
- Blok za spaljivanje
- Bireta
- Kjeltec i Destiling Unit sustav za destilaciju.
- Erlenmayerova tikvica
- Destilirana voda
- Koncentrirana sumporna kiselina
- Kloridnom kiselinom ($c=0,1 \text{ mol/L}$)
- 2 tablete katalizatora (Kjedahl-Tabletten, Roth)
- Fenolftalein

Postupak:

Odvagne se 5 g (s točnošću 0,0001 g) homogeniziranog uzorka i prebaci u kivetu od 500 mL tako da grlo kivete ostane čisto. Zatim se u kivetu stavi 25 mL koncentrirane sumporne kiseline te 2 tablete katalizatora (Kjedahl-Tabletten, Roth). Kiveta se u digestoru lagano zagrijava u bloku za spaljivanje. Kad se reakcija u kiveti smiri, grije se jače. Spaljivanje je završeno kada zaostane bistra plavo-zelena tekućina bez neizgorenih crnih komadića uzorka. Kada se sadržaj u kiveti ohladi, oprezno se razrijedi dodavanjem 80 mL destilirane vode te se sa kivetom postavlja u Kjeltec i Destiling Unit sustav za destilaciju. Postupak destilacije se provodi automatski. Dobiveni destilat sa titrira sa kloridnom kiselinom ($c=0,1 \text{ mol L}^{-1}$) te se zapiše utrošak. U

završnoj točki boje otopina postane blijedo ružičasta. Potpuno isti postupak provede se za tzv. „slijepu probu“ u kojoj se nalaze svi reagensi osim uzorka (Božanić i sur., 2010).

3.2.4. Određivanje udjela mliječne masti

3.2.4.1. Određivanje udjela mliječne masti u mlijeku butirometrijskom metodom prema Gerberu

Potreban pribor i kemikalije:

- Umjereni butirometar za mlijeko
- Čep za butirometar
- Nastavak za umetanje čepa u butirometar
- Stalak za butirometre
- Centrifuga po Gerberu
- Pipeta od 11 mL za mlijeko
- Pipeta od 10 mL za sumpornu kiselinu
- Pipeta od 1 mL za amilni alkohol
- Koncentrirana sumporna kiselina (Gerberova; $\varphi=1,815-1,820$)
- Izoamilni alkohol

Postupak:

U butirometar se najprije otpipetira sumporna kiselina (10 mL), zatim mlijeko (11 mL) pa na kraju izoamilni alkohol (1 mL). Mlijeko se u butirometar pušta tako da mlaz mlijeka ne udara izravno u sumpornu kiselinu, nego prvo u stienku butirometra iznad sloja sumporne kiseline. Metoda se zasniva na kemijskom otapanju proteina mlijeka (kazeina) i zaštitne opne globula mliječne masti sumpornom kiselinom. Radi lakšeg odvajanja masti dodaje se amilni alkohol koji snižava površinsku napetost mlijeka. Kada je punjenje završeno, tijelo butirometra čvrsto se obuhvati

lijevom rukom, a desnom rukom se začepi čepom. U napunjenom i zatvorenom butirometru ostaje nešto praznog prostora što omogućava trešnju butirometra, da se sadržaj može promiješati. Mućkati trešnjom treba odmah nakon punjenja kako mlijeko ne bi očvrsnulo. Butirometri se zatim stavljaju na centrifugu koja je temperirana na 65°C i tako 5 minuta pri 1200-1300 okretaja/min. Nakon centrifuge slijedi očitavanje. Dužina stupca masti odgovara udjelu masti u mlijeku izraženom u masenim postocima, a očitava se u smjeru porasta oznake brojeva na skali, prvo cijelih postotaka pa desetinki postotaka udjela masti u mlijeku (Božanić i sur., 2010).

3.2.4.2. Određivanje udjela mliječne masti u siru metodom po Gerber-Siegfeld-Teichertu

Potreban pribor i kemikalije:

- Stakleni štapić
- Staklena čašica
- Bunsenov plamenik
- Azbestna mrežica
- Umjereni butirometar za mlijeko
- Čep za butirometar
- Nastavak za umetanje čepa u butirometar
- Stalak za butirometre
- Centrifuga po Gerberu
- Pipeta od 10 mL za sumpornu kiselinu
- Pipeta od 1 mL za amilni alkohol
- Laboratorijska vaga
- Sumporna kiselina gustoće 1,520 g cm⁻³
- Izoamilni alkohol

Postupak:

2 do 2,5 g usitnjenog sira odvaže se u staklenu čašicu i doda se 10 mL sumporne kiseline (H_2SO_4 , $\rho=1,52$) pa se sadržaj zagrijava na slabom plamenu u vodenoj kupelji. Tijekom zagrijavanja sadržaj se stalno miješa. Kada se sir potpuno otopi, sadržaj se prelije u butirometar za mlijeko, a tikvica se nekoliko puta ispere malom količinom kiseline pazeći da ukupni volumen otopine ne prijeđe 19 mL. Nakon toga se u butirometar doda 1 mL izoamilnog alkohola, začepi se čepom i mućka se 2-3 minute. Uzorci se zatim centrifugiraju u temperiranoj centrifugi (65°C), 5 minuta pri 1200-1300 okretaja min^{-1} (Božanić i sur., 2010).

3.2.5. Određivanje kiselosti

3.2.5.1. Određivanje kiselosti pH metrom

pH mlijeka

Potreban pribor i kemikalije:

- pH-metar
- Čaša od 100 mL

Postupak:

Prije upotrebe elektroda je kalibrirana prema uputama proizvođača. Elektroda se zatim polagano uroni u čašu s mlijekom, lagano miješa i očitava kada se pH vrijednost na zaslonu ustali. Između dva mjerenja elektrodu je potrebno isprati destiliranom vodom i posušiti staničevinom. Nakon obavljenih očitavanja elektrodu pH-metra potrebno je dobro isprati destiliranom vodom, pobrisati staničevinom, uroniti u otopinu KCl-a te tako čuvati do iduće uporabe (Božanić i sur., 2010).

pH sira

Potreban pribor i kemikalije:

- pH-metar
- Prokuhana i ohlađena destilirana voda
- Čaša od 100 mL
- Stakleni štapić
- Laboratorijska vaga

Postupak:

Sir se pomiješa s prokuhanim i ohlađenom destiliranom vodom u omjeru 3:10 i zatim se mjeri pH- vrijednost uranjanjem elektrode pH-metra u homogeniziranu smjesu sira i vode (Božanić i sur., 2010).

3.2.5.2. Određivanje titracijske kiselosti (Kiselost po Soxhelt-Henkelu)

Kiselost mlijeka po Soxhelt-Henkelu

Smjesa 20 mL mlijeka + 1 mL fenoftaleina se titrira sa 0, 1M NaOH do crvenkaste boje koja je stabilna jednu minutu (Božanić i sur., 2010). Izračun kiselosti radi se prema formuli:

$$\text{mL NaOH} \times 2 \times f = ^\circ\text{SH}$$

Određivanje titracijske kiselosti sira

Potreban pribor i reagensi:

- Bireta
- Pipeta od 1 mL
- Laboratorijska vaga
- Porculanski tarionik sa tučkom
- Erlenmeyerova tikvica od 100 mL
- 0,1 M otopina NaOH

- 2%-tna otopina fenolftaleina
- Destilirana voda

Postupak:

5 g sira odvaže se u tarionik i otopi uz dodavanje malih količina destilirane vode temperature 50°C te se kvantitativno prenese u Erlenmayerovu tikvicu, tako da ukupna količina vode bude 100 mL. Dobivenoj emulziji doda se 1 mL fenolftaleina i titrira se s 0,1 M NaOH do pojave blijedo crvene boje koja se zadrži 2 minute (Božanić i sur., 2010).

Izračun: Titracijska kiselost ($^{\circ}\text{SH}$) = $a \times f \times 8$

3.2.6. Mikrobiološke analize sira i mlijeka

U svježem i pasteuriziranom mlijeku se određivao ukupan broj mikroorganizama (Tryptic Glucose Yeast Agar, Biolife, Italija), broj kvasaca i plijesni (Sabouraud Dextrose Agar, Biolife, Italija), enterobakterija (Violet Red Bile Glucose Agar, Biolife, Italija) dok se u siru uz sve navedene analize još određivali koagulaza pozitivni stafilocoki (Baird Parker Argar, Biolife, Italija).

3.2.6.1. Priprema fiziološke otopine

Potreban pribor i reagensi:

- Staklena boca
- Dispenzer
- Epruvete
- Stalak za epruvete
- Aluminijska folija
- Autoklav
- NaCl
- Destilirana voda

Postupak:

Za pripremu 0,9 % fiziološke otopine, u prethodno steriliziranoj staklenoj boci, pomiješa se 9 g NaCl za analize i 1 L destilirane vode. 9 mL otopine se dispencerom razdijeli u epruvete, one se začepi te stave na sterilizaciju 121°C/15min (Božanić i sur., 2010).

3.2.6.2. Priprema otopine natrijevog citrata dihidrata

Potreban pribor i reagensi:

- Menzura
- Autoklav
- Erlenmayerova tikvica
- Staklena boca
- Čep za staklenu bocu
- Destilirana voda
- Natrijev citrat dihidrat

Postupak:

Za pripremu 2% otopine otopi se 20 g natrijevog citrata dihidrata (Gram Mol, Zagreb) u 1 litri čiste, destilirane i demineralizirane vode. Otopina se zatim menzurom razdijeli u staklene boce (180 ml), one se zatvore te stave u autoklav na sterilizaciju 121°C/15min (Božanić i sur., 2010).

3.2.6.3. Priprema mikrobiološke podloge za određivanje ukupnog broja bakterija

Dehidrirane podloge moraju se čuvati na suhom i tamnom mjestu pri temperaturi +15 do +25°C. Kutije sa podlogom potrebno je dobro zatvoriti nakon svake upotrebe, te se u idealnim uvjetima skladištenja, dehidrirane podloge mogu čuvati maksimalno pet godina. Za pripremu mikrobiološke

podloge odvagane se 23,5 grama dehidrirane podloge te je dodano 1 litre čiste, destilirane i demineralizirane vode kako bi se dobila homogena suspenzija. Smjesa se zatim zagrije do vrenja kako bi se sastojci otopili te se zatim razdijeli u staklene boce. Boce se stave u autoklav na sterilizaciju na 121 °C tijekom 15 minuta. U ovo vrijeme nije računato vrijeme potrebno za zagrijavanje i hlađenje autoklava. Nakon sterilizacije i izjednačavanja tlaka boce su izvađene iz autoklava i odmah ohlađene pod mlazom hladne vode kako bi minimizirali vrijeme izloženosti podloge toplini (Božanić i sur., 2010).

3.2.6.4. Priprema mikrobiološke podloge za određivanje ukupnog broja bakterija, broja kvasaca i plijesni te broja enterobakterija

Podloge za određivanje ukupan broj bakterija (Tryptic Glucose Yeast Agar) i za određivanje broja kvasaca i plijesni (Sabouraud Dextrose Agar) su pripremljene prema uputi proizvođača tako da se odgovarajuća količina otopila i homogenizirala u destiliranoj vodi, sterilizirala na 121 °C tijekom 15 minuta u autoklavu, ohladila i čuvala na tamnom i hladnom mjestu do upotrebe.

Podloga za određivanje broja enterobakterija (Violet Red Bile Agar) su pripremljene prema uputi proizvođača tako da se odgovarajuća količina otopila i homogenizirala u destiliranoj vodi te zagrijava do vrenja, nakon čega je ohlađena na temperaturu od otprilike 45°C te u sterilnim uvjetima razlivena u sterilne, jednokratne Petrijeve ploče. Razlivena podloga je potom ohlađena na sobnu temperaturu te su Petrijeve ploče s razlivenom podlogom čuvane u hladnjaku do uporabe (Božanić i sur., 2010).

3.2.6.5. Priprema mikrobiološke podloge za određivanje koagulaza pozitivnih stafilokoka

Za pripremu ove mikrobiološke podloge odvagane se 58 grama dehidrirane podloge Baird Parker Agara te se doda 1 litre čiste, destilirane i demineralizirane vode kako bi se dobila homogena suspenzija. Smjesa se zatim zagrije do vrenja kako bi se sastojci otopili te se sterilizira u autoklavu 121 °C tijekom 15 minuta. Nakon sterilizacije podloga se ohladi na približno 50°C te se u aseptičnim uvjetima zatim doda 50 mL Egg Yolk Tellurite emulzije 20 % (Code 423700). Sve se zatim dobro promiješa i razdijeli u sterilne Petrijeve zdjelice. Podlogu treba pustiti 15 minuta da se skrutne, a zatim se okrene dnom prema gore i tako se čuva u frižideru do upotrebe (Božanić i sur., 2010).

3.2.6.6. Priprema uzoraka za mikrobiološko ispitivanje

Određivanje ukupnog broja bakterija provedeno je metodom naciepljivanja decimalnog razrjeđenja na odgovarajuće hranjive podloge. Odvagne se 20 g uzorka u sterilnu staklenu posudu. Uzorak se zatim prebaci u sterilni tarionik te se tamo homogenizira sa tučkom i otopi sa 180 mL 2% otopine natrijevog citrata. Iz homogeniziranog uzorka sira 1 mL prenijeti u epruvetu sa 9 mL fiziološke otopine. Kod svježeg i pasteriziranog mlijeka direktno se uzima 1 mL homogeniziranog uzorka sobne temperature te se prenese u epruvetu sa 9 mL sterilne fiziološke otopine. Nastalo razrjeđenje dobro homogenizirati, te iz epruvete u koju je dodan uzorak uzeti čistom sterilnom pipetom 1 mL homogeniziranog razrjeđenja i prenijeti u epruvetu sa 9 mL, sterilne fiziološke otopine. Postupak ponavljati dok se ne dobije željeni broj razrjeđenja (Božanić i sur., 2010).

3.2.6.7. Naciepljivanje i inkubacija ukupnog broja bakterija te kvasaca i plijesni

Mikropipetom se uzme 1 mL decimalnog razrjeđenja mlijeka ili sira i otpusti u Petrijevu ploču. Od svakog se razrjeđenja pripreme 2 paralele. Nakon toga se Petrijeve ploče s uzorkom zaliju s 20-25 mL hranjivog supstrata (agara), prethodno rastopljenog u vodenoj kupelji na 45°C. Temperatura čuvanja rastopljene i ohlađene podloge ne smije biti puno viša ili niža jer se agar skrućuje na 42°C, a temperatura preko 50°C može oštetiti ili usmrtiti bakterije. Odmah nakon nalijevanja agara, on se jednolično promiješa kružnim pokretom. Ploče se zatim puste da se ne skrutne te se zatim okrenu s poklopcem prema gore te se stave u termostat na inkubaciju (Božanić i sur., 2010).

Inkubacija: 30°C/ 72 h

3.2.6.8. Nacjepljivanje i inkubacija *Enterobacteriae* i koagulaza pozitivnih stafilokoka

Mikropipetom se uzme 100 µL decimalnog razrjeđenja mlijeka ili sira i otpusti na BP agar u Petrijevu ploču. Zatim se uzme štapić po Drigalskom koji se najprije uroni u 96 % etanol, sterilizira u plamenu, te se pričekava da se malo ohladi i zatim se njime razmaže uzorak u Petrijevoj ploči. Ploča se okrene s dnom prema gore te stavi u termostatski inkubator na inkubaciju (Sabadoš, 1998).

Inkubacija: 37°C/72h

Izgled kolonija:

Kod enterobacteria se broje bijelo-svjetlo ljubičaste, okrugle ili elipsoidne kolonije, promjera 0,5-2 mm raznih veličina i oblika dok se kod koagulaza pozitivnih stafilokoka broje crne, okrugle ili elipsoidne kolonije oko kojih je prozirna zona, promjera 0,5-2 mm raznih veličina i oblika.

Izražavanje rezultata

Na odabranom decimalnom razrjeđenju izbrojimo porasle kolonije. Iz izbrojenog broja kolonija, poraslih na hranjivoj podlozi izračunamo CFU vrijednost.

$$\text{CFU} = \frac{\text{broj poraslih kolonija}}{\text{volumen upotrebljenog uzorka}} \times \text{recipročna vrijednost decimalnog razrjeđenja (jed mL}^{-1}\text{)}$$

¹⁾

CFU= Colony- Forming Units (jedinice koje tvore kolonije)

3.2.7. Senzorska analiza

Senzorska analiza proizvoda provodila se svaki 1., 5., 9., 14. i 21. dan ovisno o roku trajanja samoga sira prema senzorskom obrascu za senzoriku (Tablica 1.) Tijekom senzorske analize ocjenjivala su se slijedeća svojstva: boja, konzistencija, miris i okus (Božanić i sur., 2010).

Tablica 6. Vlastiti obrazac za senzoriku

DATUM:			
OCJENJIVAČ:			
OCJENJIVANO SVOJSTVO	<i>Molimo upisati postignutu ocjenu za svaku svojstvo u koloni odgovarajućeg uzorka</i>		
	Uzorak 1	Uzorak 2	Uzorak 3
BOJA			
KONZISTENCIJA			
MIRIS			
OKUS			

Komentari:

Tablica 7. Obrazac za senzorsku ocjenu sira sustavom od 20 ponderiranih bodova (Filajdić i sur., 1988)

SENZORSKO SVOJSTVO	OPISNI PARAMETRI	OCJEN A	FAKTOR ZNAČAJ NOSTI	MAX. BODOVI
Okus	Jasno izražen, karakterističan za proizvod, po mlijeku, bez stranih okusa, umjerena aroma po kuhanom mlijeku, umjereno slan	4-5	2,0	10
	Preizražen okus mlijeka, preslaba aroma, nedovoljno slan, tragovi kiselosti, gorčine i užeglosti, kredast okus, tragovi stranih okusa	3		
	Proizvod stranog okusa, nekarakterističan okus, užegao, kiseo, gorak, preslan, potpuno neslan (bljutav), okus po plijesni	1-2		
Miris	Ugodan, ni presnažan ni preslab, karakterističan po mlijeku, diskretan blago kiselkast miris, bez ikakvih stranih mirisa	4-5	0,6	3
	Prenaglašen miris, nedovoljno izražen, slabije se osjeti miris mlijeka, tragovi užeglosti	3		
	Potpuno nekarakterističan za proizvod, stran, užegao, po plijesni, preizražena kisleost	1-2		
Konzistencija	Sir kompaktan, homogen, tvrdoća	5	0,8	4

	karakteristična za proizvod, bez grudica, gladak, nasumična pojava sirnih rupica/pukotina			
	Neznatno tvrđi ili mekši, neznatano ljepljiv	3-4		
	Pretvrd ili premekan sir, pjeskovit ili gnjecav, osjetno se lijepi za usta	1-2		
Boja	Karakteristična, bijela sa laganim krem do žućkastim odsjajem, jednolična po cijeloj površini	5	0,4	2
	Zamjetno neujednačene boje, malo žuće nijanse, blago prošaran	3-4		
	Zamjetna zona različitih boja površine sira, strana i nekarakteristična boja	1-2		
Izgled	Karakterističan, bez formirane kore, gladak, bijele boje, bez sluzi, na prerezu umjeren broj pukotina, jednolika boja	5	0,2	1
	Blago formirana naznaka kore na površine, neznatno nejednolika boja, naboranost površine, premalo ili previše sirnih pukotina na prerezu, urušenost, napuhnutos	3-4		

	Sluzava/ vlažna/pljesniva površina, pojava zaušenog sloja nalik kori ispod kojeg je krto i ratsresito tijelo, ljepljiva površina, pojava crvene ili narančaste boje,	1-2		
Maksimalan broj ponderiranih bodova ukupno:				20

3.2.8. Boja i tekstura sira

3.2.8.1. Boja sira

Boja sira se određivala na uređaju Konica Minolta Spectrophotometer CM-3500d (Konica Minolta, Nizozemska). Prije svakog mjerenja uređaj se najprije kalibrira. Nakon kalibracije uzorak veličine 1x1 cm stavi se na ploču sa određenim promjerom otvora te se zatim kroz njega propušta svjetlost. Spektrofotometar mjeri intenzitet svjetla koje je prošlo kroz analizirani uzorak (I) te ga uspoređuje s intenzitetom upadnog svjetla (I_0). Kao rezultat mjerenja faktora refleksije ili transmisije u pojedinim valnim područjima dobiva se spektrofotometrijska krivulja (Laboratorij za tehnološke operacije, 2008). Određivana su tri parametra boje: L (svjetlina), a (zeleno) i b (žuto).



Slika 3. Konica Minolta Spectrophotometer CM-3500d. (Laboratorij za tehnološke operacije, 2008)

3.2.8.2. *Tekstura sira*

Tekstura se određivala na uređaju Stable Micro Systems Texture Analyser TA.HD.plus (SMS Stable Micro Systems Texture Analyzer, Surrey, England) sa sondom promjera 6 mm. Uzorak se stavlja na analizator te se zatim odabiru radni parametri. Uzorak se probada cilindričnim probnim tijelom te istovremeno mjerni osjetnik prati otpor koji se javlja u materijalu uzorka uslijed prodiranja alata kroz uzorak i povratnom vezom javlja upravljačkoj jedinici radne parametre. Radni parametri su brzina, dubina i sila prodiranja. Svi ti parametri grafički se prikazuju u odabranom grafu (Laboratorij za tehnološke operacije, 2008) te graf opisuje krivulju promjene sile potrebne za kompresiju uzorka u određenom vremenu. Rezultati su analizirani uz pomoć Texture Exponent 32 softvera (verzija 3.0.5.0.). Iz dobivenih rezultata očitava se tvrdoća i elastičnost.



Slika 4. Stable Micro Systems Texture Analyser TA.HD.plus (Laboratorij za tehnološke operacije, 2008)

3.2.9. **Određivanje koncentracije mineralnih tvari u mlijeku i svježim sirevima**

U postupcima pripreme uzoraka i standarda korištena je kiselina HNO_3 (65%, v/v) i vodikov peroksid H_2O_2 (30%, v/v) (Kemika d.o.o., Hrvatska). U analizama je korištena ultra-čista voda (18 $\text{M}\Omega\text{cm}$) dobivena sustavom pročišćavanja NIRO VV UV UF 20 (Nirosta d.o.o. Water Technologies, Osijek, Croatia).

Koncentracije mineralnih tvari prisutnih u ovčjem mlijeku i svježim ovčjim sirevima određene primjenom tehnike induktivno spregnute plazme s masenom detekcijom (ICP - MS). Postupak započinje tako da se uzorci sireva i mlijeka važu u posudicama (2 g) i doda se 1 mL H_2O_2 te 6 mL HNO_3 . Mokro spaljivanje uzoraka odvija se u mikrovalnoj pećnici Multiwave 3000 (Anton Paar, Ostfildern, Njemačka) provođenjem digestije u 2 koraka: prvi korak snage 800 W 15 minuta uz zadržavanje 15 minuta te drugi korak snage 0 W 15 minuta. Otopljeni uzorci se prenesu u odmjerne tikvice od 50 mL i do vrha dopune ultra-čistom vodom. Isti postupak koristi se za slijepu probu, ali bez uzorka.

Kvantitativna analiza provedena je pomoću metode kalibracijske krivulje. Granice detekcije elemenata su izračunate kao 3 puta standardna devijacija 10 uzastopnih mjerenja slijepe probe i iznose (mg/kg): Ca 0.01, Na 0.01, K 0.025, Mg 0.02, Cu 0.01, Fe 0.005, Se 0.001, Zn 0.005 i Mn 0.01.

Koncentracije elemenata mjerene su primjenom instrumenta induktivno spregnute plazme s masenim detektorom model Optima 8000 (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, SAD). Uvjeti rada instrumenta ICP - MS prikazani su u tablici 8.

Rezultati koncentracija elemenata obrađeni su statističkim programom Statistica 6.1. (StatSoft Inc., Tulsa, SAD). Koncentracije su izražene kao srednje vrijednosti dobivenih rezultata (Bilandžić i sur., 2014).

Tablica 8. Instrumentalni uvjeti rada za ICP-MS (Bilandžić i sur., 2014)

Uvjeti	Elementi	
	Ca, K, Na, Mg	Cu, Fe, Zn, Se, Mn
Plazma mod	Radijalni	Aksijalni
Vrijeme čitanja	1-5 s	1-5 s
Replike	3	3
Rf snaga	1000 W	1300 W
Protok argona	8 L/min	15 L/min
Raspršivač argona	0,85 L/min	0,55 L/min
Sporedni protok	0,2 L/min	0,2 L/min
Brzina unosa uzorka	1,5 mL/min	1,5 mL/min
Unutarnji promjer injektora	2,0 mm	2,0 mm
Nebulizer	Stakleni koncentrični (Meinhard)	Stakleni koncentrični (Meinhard)
Vrsta raspršivača	Stakleni ciklonski	Stakleni ciklonski

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj starter i protektivnih kultura na svojstva svježeg sira. Za proizvodnju sira korišteno je mlijeko kupljeno od obiteljskog poljoprivrednog gospodarstva Šmida (OPG Šmida, Vrbovec). Mlijeko je pasterizirano i podsireno uz pomoć kultura Probat 222, CHOOZIT BT01 i CHOOZIT MA11 (sve Du-Pont, Danisco, Francuska). U drugoj seriji pokusa uz prethodno navedene mezofilne kulture korišteno je i sirilo (Medimon d.o.o, Split, Hrvatska). U zadnjoj seriji pokusa izabran je sir koji ima najdužu trajnost i ponovio postupak proizvodnje, ali na način da se dodala protektivna kultura Holdbac YM-C Plus (Du-Pont, Danisco, Francuska) prema uputi proizvođača.

Prinos sira, udio suhe tvari, proteina i mliječne masti prikazani su u tablici 9. Kiselost sira određivana je mjerenjem pH sira i titracijskom metodom po Soxhelt-Henkeli, a rezultati su prikazani na slikama 5. i 6. U tablicama 10., 11., 12. i 13. prikazani su rezultati mikrobiološke analize sira. Određivan je ukupan broj bakterija, kvasci i plijesni, *Staphylococcus aureus* te enterobakterije. Vrijednosti su logaritmirane i prikazane kao $\log \text{cfu g}^{-1}$. U tablici 10. prikazani su rezultati senzorske analize svježeg sira. Prihvatljivost svježeg sira ocjenjivana je uz pomoć obrasca za senzorsku analizu sa sustavom od 20 ponderiranih bodova. Na slikama 7.-14. prikazane su prosječne ocjene za pojedinačna senzorska svojstva. U tablicama 15. i 16. prikazani su tekstura i svojstvo elastičnosti svježeg sira. U tablici 17. prikazana je boja svježeg sira izražena kroz vrijednosti L (svjetlina), a (zeleno), b (žuto). U tablici 18. prikazan je mineralni sastav svježeg sira.

4.1. PRINOS SIRA, UDIO SUHE TVARI, PROTEINA I MLIJEČNE MASTI

Tablica 9. Prinos sira, udio suhe tvari, proteina i mliječne masti izražene kao srednje vrijednosti

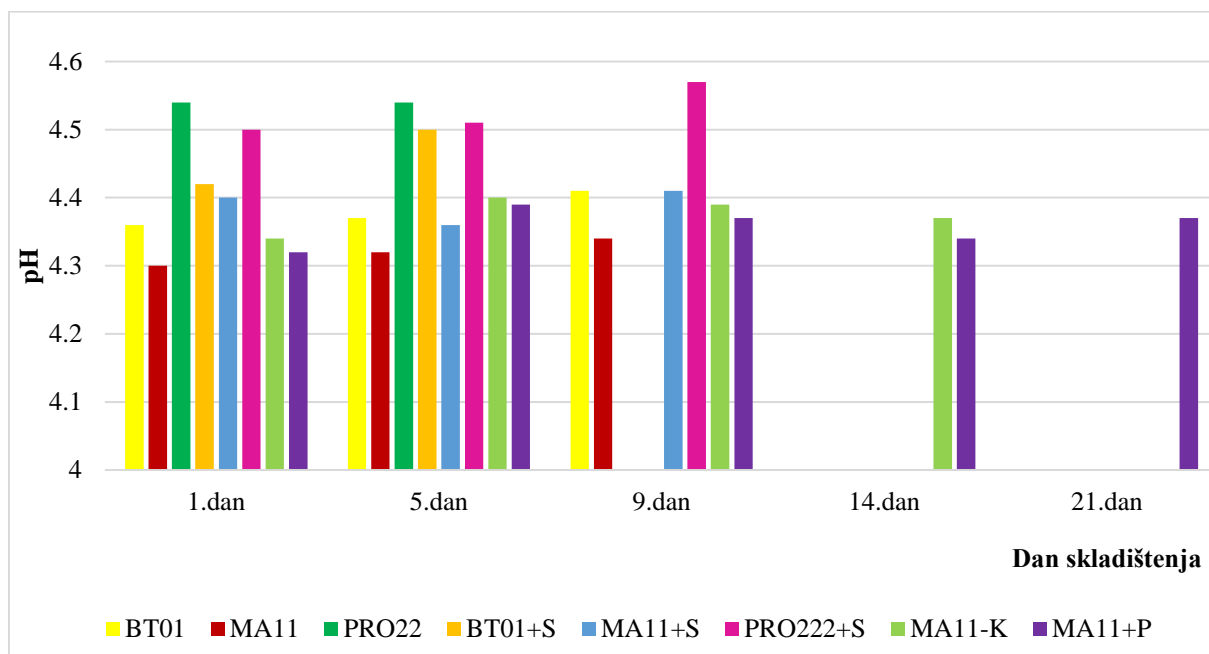
	Prinos sira (kg L ⁻¹ mlijeka)	Suha tvar (%)	Proteini (%)	Mliječna mast (%)
BT01	0,28	21,31	13,75	0,7
MA11	0,29	21,62	13,72	0,47
PRO222	0,27	21,06	13,76	0,95
BT01+s	0,24	23,62	14,37	0,73
MA11+s	0,27	22,49	13,42	0,47
PRO222+s	0,26	23,00	15,66	0,47
MA11-k	0,31	23,04	14,36	1,45
MA11+p	0,29	21,79	15,26	0,97

Ovisno da li se sir proizvodi samo uz dodatak mezofilne kulture, mezofilne kulture i sirila ili mezofilne i protektivne kulture može se vidjeti da se prinos sira mijenja. U tablici 9. prikazan je prinos sira. Vidljivo je da je najveći prinos bio uz dodatak mezofilne kulture MA11 dok je najmanji prinos bio uz dodatak mezofilne kulture BT01 i sirila. Dodatak sirila utječe na veću čvrstoću grušta što posljedično utječe i na manji udio vode, te na manji prinos. Na prinos sira utječu i mnogi drugi faktori kao što su sastav mlijeka, udio kazeina, sastav mlijeka, broj somatskih stanica u mlijeku, pasterizacija mlijeka, tip koagulanta, dizajn posude, čvrstoća kod rezanja i proizvodni parametri (Valkaj, 2015). Prinos sira bitan je i ekonomski parametar kod proizvodnje sira, jer već i male razlike u prinosu donose veliku razliku u dobiti (Abd El Gavah i Ahmed, 2011). U usporedbi sa Minas svježim sirom čiji je prosječni prinos 0,19 kg L⁻¹ mlijeka (Sant'Ana i sur., 2013) upotrebom ovih kultura dobio se puno veći prinos.

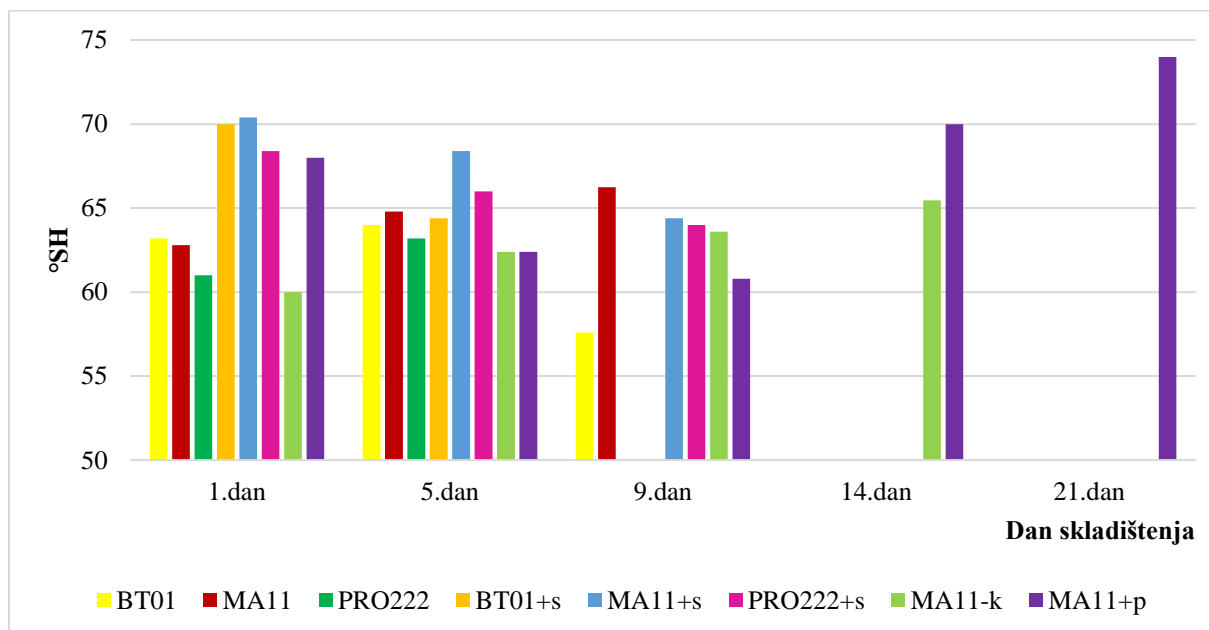
Najveći je udio proteina bio u siru PRO222+s proizvedenom uz dodatak mezofilne kulture i sirila i iznosio je 15,66 g (100g)⁻¹. Taj je udio sličan onome u Minas svježem svježem siru koji je

proizveden uz dodatak mezofilne kulture i sirila iznosio je $15,35 \text{ g (100g)}^{-1}$ (Sant'Ana i sur., 2013). Ostali su sirevi imali manji udio proteina koji je u prosjeku iznosio $13,42\text{-}14,37 \text{ g (100g)}^{-1}$. U istraživanju Telis-Romero i sur. (2011) prosječan udio proteina iznosio je između $7.9 \pm 0.4\text{-}14.8 \pm 0.7 \text{ g (100g)}^{-1}$. Uzorci sira uz dodatak mezofilne kulture i sirila imali su veći udio suhe tvari pa je posljedično je i udio proteina i mineralnih tvari bio veći. Veći udio proteina u svježem siru potječe od kazeina mlijeka, dok se kod pasteuriziranog mlijeka, u siru zadržava i mala količina termolabilnih proteina sirutke (svega 4-6% ukupnog udjela proteina u siru) (Havranek i sur., 2014; Tratnik i Božanić, 2012). Proteini sirutke znatno su hidrofilniji od kazeina te zaostaju u otopini nakon koagulacije kazeina i odvajanja sirnog gruš. Zbog toga se ne talože pri svojoj izoelektričnoj točki jer još uvijek sadržavaju veću količinu vezane vode, što rezultira većim udjelom vode u siru (Tratnik i Božanić, 2012). Udio suhe tvari u sirevima kretao se između 21,06-23,62%. Taj je udio nešto viši nego što je bio u istraživanju koje su proveli Telis-Romero i sur. (2011) gdje se udio suhe tvari kretao od 24-17,1%. Najveći je udio suhe tvari imao sir BT01+s proizveden uz dodatak mezofilne kulture i sirila. Tijekom proizvodnje mlijeko je bilo obrano na manje od 1% mliječne masti te je stoga i udio mliječne masti u siru bio nizak i kretao se od 0,47 do 1,45%.

4.2. KISELOST SIRA



Slika 5. Kiselost (pH) različitih uzoraka sira izražena kao pH vrijednost tijekom 21 dan hladnog skladištenja



Slika 6. Prosječna titracijska kiselost (%SH) svježeg sira tijekom 21 dan hladnog skladištenja

Tijekom čuvanja sirevima je određivana kiselost te je utvrđeno da su oba određivana parametra (pH vrijednost i titracijska kiselost) svih sireva bila stabilna tijekom roka trajanja. Oscilacije u kiselosti bile su minimalne, a pH vrijednost se kretala u rasponu od 4,54 do 4,32 dok su razlike u titracijskoj kiselosti bile nešto veće i to u rasponu između 57,6 do 74°SH. U istraživanju koje su proveli Lante i sur. (2006) pH talijanskih svježih sireva Crescenza i Squacquerone iznosio je 5,05-5,21, a sirevi proizvedeni u ovom istraživanju bili su nešto kiseliji. Iz slika 5. i 6. također je vidljivo da porastom pH vrijednosti pada °SH i obrnuto. Kiselost sira utječe na nastajanje karakteristične arome, a niske pH vrijednosti djeluju inhibitorno na rast mikroorganizama ili usporavaju njihov rast. Iako kiselost prvobitno utječe na okus, ovaj se parametar mjeri kako bi se kontrolirala kvaliteta mlijeka i mliječnih proizvoda. Kako se sama kiselost mlijeka tijekom vremena povećava, mjerenjem ovog parametra ujedno se i kontroliraju uvjeti skladištenja. Prirodna kiselost mlijeka potječe od kiselih svojstava proteina, kiselih soli fosfata i citrata, a manje od albumina, globulina i CO₂. Rezultat velike titracijske kiselosti je najčešće i rezultat većeg udjela proteina, fosfata i kalcija u mlijeku što ne utječe na smanjenje pH vrijednosti mlijeka (Babić, 2009). Pad pH u siru uzorkovala je mliječna kiselina koja je nastajala fermentacijom te CO₂ koji se povezuje s nastankom karbonske kiseline. U pojedinim slučajevima vidljivo je da dolazi do povećanja pH što se može objasniti aktivnošću kvasaca i plijesni koji metaboliziraju mliječnu kiselinu u alkalne komponente i na taj način podižu cjelokupnu vrijednost pH u svježem siru (Kizilirmak Esmer i sur., 2009).

4.3. MIKROBIOLOŠKA ANALIZA SVJEŽEG SIRA

Prema Vodiču za mikrobiološke kriterije za hranu (2009) analizirao se ukupan broj mikroorganizama, kvasaca i plijesni, enterobakterija i broj koagulaza pozitivnih stafilkoka vrste *Staphylococcus aureus*. Uzorci sira koji nisu zadovoljili mikrobiološke kriterije iz Vodiča za mikrobiološke kriterije (2009) nisu bili dalje analizirani. Oni su kao takvi neispravni i ne bi se smjeli stavljati na tržište. Za svaki uzorak sira rađene su paralelne probe te ukoliko je jedan uzorak imao veći broj ukupnih bakterija od dopuštenog smatralo se da je to kraj roka trajanja.

4.3.1. Ukupan broj mikroorganizama

Tablica 10. Ukupan broj (log cfu g⁻¹) mikroorganizama svježeg sira tijekom 21 dana hladnog skladištenja.

	1.dan	5.dan	9.dan	14.dan	21.dan
	log cfu g ⁻¹	log cfu g ⁻¹	log cfu g ⁻¹	log cfu g ⁻¹	log cfu g ⁻¹
MA11	2,26	2,57	3,19	-	-
PRO222	2,48	2,39	-	-	-
BT01	2,87	2,54	3,27	-	-
MA11 +s	2,41	2,21	3,13	-	-
PRO222+s	2,39	2,83	2,69	-	-
BT01+s	2,73	2,69	-	-	-
MA11-k	1,83	1,77	1,58	-	-
MA11+p	2,26	2,40	1,11	2,43	2,93

U Tablici 10. prikazani su rezultati ukupnog broja aerobnih mezofilnih bakterija po danima skladištenja. Najduži je rok trajanja imao sir proizveden uz pomoć mezofilne kulture MA11 i protektivne kulture. Kada se mezofilnoj kulturi dodala i protektivna kultura može se vidjeti da ukupan broj bakterija nije rastao te da su i nakon 21. dana vrijednosti bile u granicama dopuštenih vrijednosti prema Vodiču (2011). Kao proizvod metaboličke aktivnosti ovih bakterija stvaraju se različite supstance koje doprinose poboljšanju trajnosti fermentiranih proizvoda te tako djeluju inhibitorno na rast mikroorganizama. Protektivne kulture sastoje se od bakterija koje su specifično odabrane zbog sposobnosti inhibicije rasta patogenih organizama ili

mikrobioloških agenasa kvarenja i imaju GRAS (općenito smatran sigurnim) status (Young i Sullivan, 2011). Tijekom 9 dana skladištenja prosječne se vrijednosti kreću najviše do 3,27 log cfu g⁻¹ što je manje nego što je bilo dobiveno u istraživanju koje su proveli Dermiki i sur. (2008) gdje su se prosječne vrijednosti kretale oko 7 log cfu g⁻¹.

4.3.2. Ukupan broj kvasaca i plijesni

Tablica 11. Ukupan broj (log cfu g⁻¹) poraslih kolonija kvasaca i plijesni svježeg sira tijekom 21 dana hladnog skladištenja

	1.dan log cfu g ⁻¹	5.dan log cfu g ⁻¹	9.dan log cfu g ⁻¹	14.dan log cfu g ⁻¹	21.dan log cfu g ⁻¹
MA11	1,60	1,72	3,04	-	-
PRO222	1,46	1,47	-	-	-
BT01	2,16	1,43	3,02	-	-
MA11 +s	0,30	2,35	1,76	-	-
PRO222+s	1,15	1,14	3,51	-	-
BT01+s	0,87	1,15	-	-	-
MA11-k	1	1,58	2,32	-	-
MA11+p	0,39	0,37	1	1,45	2,81

Osim za sireve koji zriju s plijesnima ili mazom na površini sira, kontaminacija sira kvascima i plijesnima nepoželjna je i smatra se pogreškom za sve ostale sireve (Havranek i sur., 2014). Kontaminacija kvascima i plijesnima jedan je od glavnih uzroka kvarenja svježeg sira. Ovi mikroorganizmi, osim što uzrokuje teške ekonomske gubitke i značajno smanjuju rok trajanja proizvoda, mogu predstavljati opasnost po zdravlje, osobito plijesni koje imaju sposobnost

proizvodnje mikotoksina (Filtenborg i sur., 1996; Fleet, 1990; Smits i Brul, 2005). Do sada se kontrola rasta kvasaca i plijesni najčešće obavljala uz pomoć kemijskih aditiva, ali upotreba novih protektivnih kultura vrlo je obećavajuća, posebice za sirarstvo. U tablici 11. prikazan je broj poraslih kolonija kvasaca i plijesni po danima skladištenja. Može se vidjeti da se dodatkom protektivnih kultura njihov rast inhibirao. *Penicillium* spp. i *Aspergillus* spp. dominantne su plijesni u kvarenju sireva bez dodatka konzervansa; te kod tvrdih, polutvrdih te najčešće rastu na površini, dok su *Candida* spp., *Kluyveromyces marxianus* i *Pichia* spp. glavni kontaminanti kod nezrelih mekih sireva (Fleet, 1990; Filtenborg i sur., 1996). *Penicilium comune* najraširenija je plijesan na svim vrstama sireva (Havranek i sur., 2014). Heterofementativna priroda kvasaca uvjetuje stvaranje alkohola i CO₂ u siru, tako da se ova pogreška vrlo jednostavno može pripisati kvascima i u slučajevima kada kolonije kvasaca nisu vidljive (Havranek i sur., 2014). Kvasci također mogu biti uzročnici kvarenja, intenzivne proizvodnje plina, pojave stranog okusa i služi te diskoloracije (Fleet, 1990). Gonzalez-Fandos i sur. (2000) proveli su istraživanje u kojem su određivali mikrobiološke, fizikalno-kemijske i senzorske karakteristike Cameros svježeg sira pakiranog u modificiranu atmosferu. Rezultati istraživanja pokazali su da je u kontrolnom uzorku koji je bio zapakiran u normalnu atmosferu rast kvasaca i plijesni u svježem siru bio ograničen. Tek je 21. dan skladištenja u uzorku bilo 3,73 log cfu g⁻¹ dok je 28. dan broj kvasaca i plijesni iznosio 3,34 log cfu g⁻¹. U istraživanju koje je provela Marasović (2017) kvasci i plijesni su detektirani tek 6. dan skladištenja te je njihov broj iznosio 0,20 log cfu/g dok je 9. dan to bilo 0,35 log cfu g⁻¹. Broj kvasaca i plijesni u oba istraživanja bio je manji nego u ovom istraživanju gdje je njihov broj već prvi dan skladištenja iznosio od 0,30 log cfu/g pa sve do 2,16 log cfu g⁻¹.

4.3.3. Ukupan broj *Staphylococcus aureus* tijekom skladištenja

Tablica 12. Ukupan broj (log cfu g⁻¹) poraslih kolonija *Staphylococcus aureus* su uzorcima svježeg sira tijekom 21 dana hladnog skladištenja

	1.dan	5.dan	9.dan	14.dan	21.dan
	log cfu g ⁻¹	log cfu g ⁻¹	log cfu g ⁻¹	log cfu g ⁻¹	log cfu g ⁻¹
MA11	1,6	0	2,74	-	-
PRO222	2,18	0,60	-	-	-
BT01	1,04	0	2,30	-	-
MA11 +s	1,18	1,40	2,56	-	-
PRO222+s	1,17	1,63	2,36	-	-
BT01+s	1,54	2,11	-	-	-
MA11-k	1,34	1,48	1,30	-	-
MA11+p	0	0,70	0	1	1,40

U tablici 12. prikazan je ukupan broj poraslih kolonija *Staphylococcus aureus* tijekom skladištenja. Može se vidjeti da je dodatak protektivne kulture siru s mezofilnom kulturom MA11 produžio rok trajanja. Sposobnost rasta bakterije *S. aureus* u svježim sirevima inhibirana je brzim stvaranjem visoke koncentracije mliječne kiseline i posljedično tome niskom pH vrijednosti sira (Samaržija i sur., 2007). Zadnji dan analize kod uzorka MA11, BT01 i PRO222+s broj poraslih kolonija *S. aureus* bio je veći nego što je dozvoljen Vodičem za mikrobiološke kriterije za hranu (2011) što je ukazalo na kraj roka trajanja tih proizvoda te se ti uzorci se nisu više analizirali. Velik broj sojeva *S. aureus* sposoban je stvarati ekstracelularne termostabilne enterotoksine, koji svoju biološku aktivnost zadržavaju i nakon toplinske obrade mlijeka i/ili sirnog gruša (Walstra i sur., 1999). Zbog svoje termorezistentnosti nakon toplinske obrade (100°C/30min), stafilokokni enterotoksini smatraju se najvećim mikrobiološkim rizikom u svježem siru. Oni su otporni na većinu proteolitičkih enzima probavnog trakta čovjeka i proteolitičkih enzima sira te su otporni na nisku pH vrijednost želuca čovjeka (Havranek i sur., 2014). Zbog specifičnosti tih bakterija i kompleksnosti sira kao uzgojenog medija, ponekad je vrlo teško napraviti početnu procjenu rizika (Samaržija i sur., 2007).

4.3.4. Ukupan broj enterobakterija

Tablica 13. Ukupan broj (log cfu g⁻¹) poraslih kolonija enterobakterija u uzorcima svježeg sira tijekom 21 dana hladnog skladištenja

	1.dan	5.dan	9.dan	14.dan	21.dan
	log cfu g ⁻¹	log cfu g ⁻¹	log cfu g ⁻¹	log cfu g ⁻¹	log cfu g ⁻¹
MA11	1,00	0	1,89	-	-
PRO222	0,87	1,65	-	-	-
BT01	1,54	1,38	3,36	-	-
MA11 +s	0,40	1,44	2,05	-	-
PRO222+s	1,41	1,65	3,53	-	-
BT01+s	1,65	2,06	-	-	-
MA11-k	1,95	1,00	1,40	-	-
MA11+p	0,70	2,08	1,48	1,60	1,40

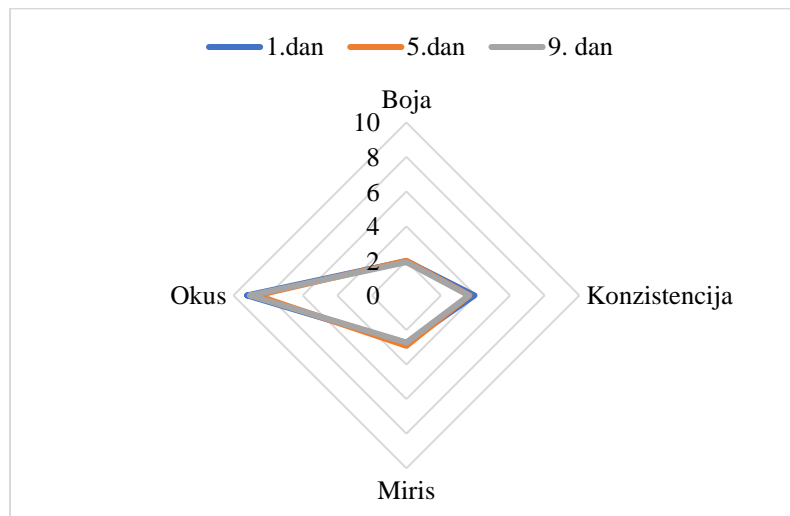
U tablici 13. prikazan je ukupan broj enterobakterija. Može se vidjeti da se kolonije enterobakterija pojavljuju, ali unutar granica dopuštenosti. Prema Giammanco i sur., kvaliteta mlijeka sira, kao i higijenskog stanja tijekom proizvodnje, pakiranja i rukovanja sirom analizom količine *Enterobacteriaceae* u uzorcima sira. Različite vrste *Enterobacteriaceae* imaju sposobnost dekarboksiliranja i lizina i ornitina, što dovodi do proizvodnje biogenih amina kadaverina i putrescina (Westlin i sur., 2016). 5. dan skladištenja sira proizvedenog uz dodatak mezofilne kulture PRO22 mogao se osjetiti feklani okus, a prema Ardo-u (Ardö, 2006) tome su vjerojatno doprinijeli kadaverin i putrescin. U istraživanju Goznalez-Fandos i sur. (2000) na svježem siru Cameros određivan je ukupan broj enterobakterija. Fekalni koliformi bili su detektirani tek nakon 14 dana skladištenja kada je njihov broj iznosio 1,18 log cfug⁻¹, a maksimalna razina dosegla je 21 dan kada je broj iznosio 1.97 log cfug⁻¹. U ovom su istraživanju enterobakterije detektirane već prvog dana te je njihov broj varirao od 0,40 log cfu g⁻¹ pa sve do 1,95 log cfu g⁻¹.

4.4. SENZORSKA ANALIZA

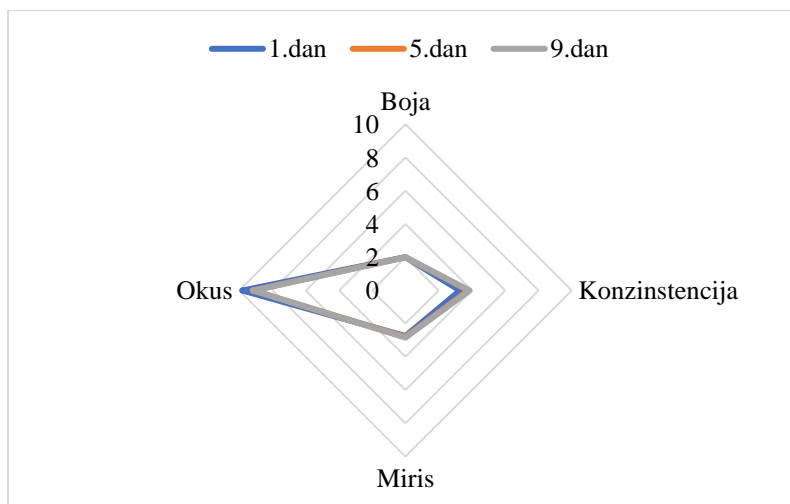
Tablica 14. Ukupan broj bodova postignut senzorskom analizom proizvedenih uzoraka svježeg sira tijekom 21 dana hladnog skladištenja

UKUPAN BROJ BODOVA					
UZORAK	1.dan	5.dan	9.dan	14.dan	21.dan
BT01	18,39	16,43	17,35	-	-
MA11	18,24	16,45	17,84	-	-
PRO222	18,56	16,43	-	-	-
BT01 +s	16,81	16,44	-	-	-
MA11+s	16,08	16,43	16,52	-	-
PRO222+s	17,78	16,44	17,53	-	-
MA11-k	18,17	16,44	16,6	-	-
MA11+ P	18,56	16,43	18,01	18,27	17,98

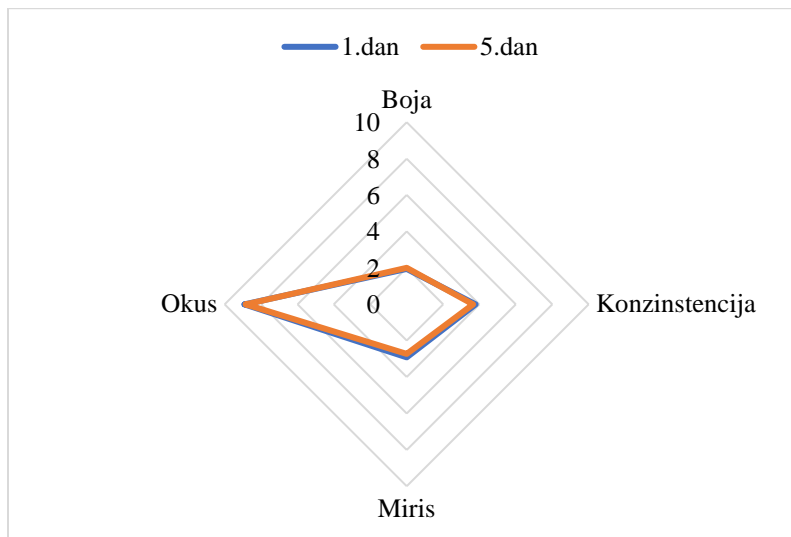
a)



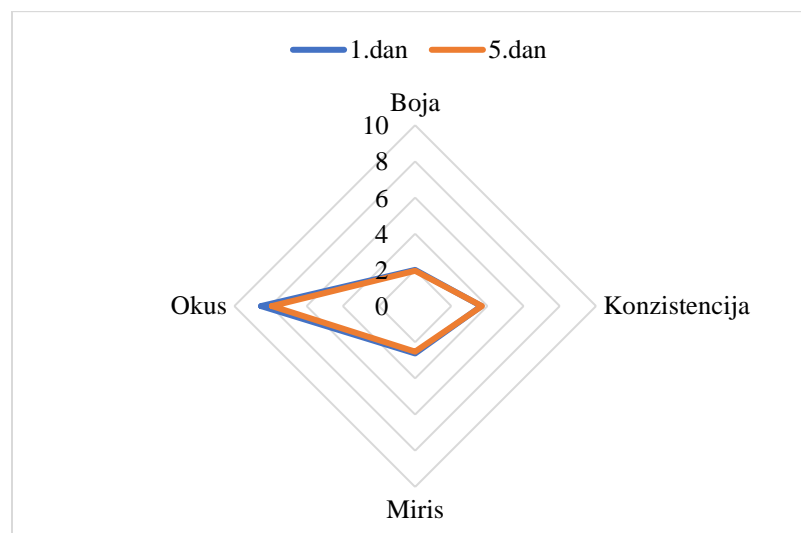
b)



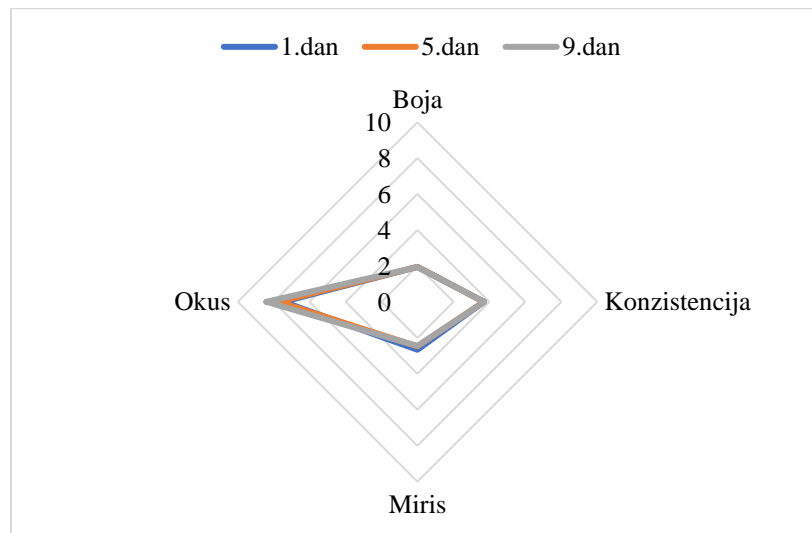
c)



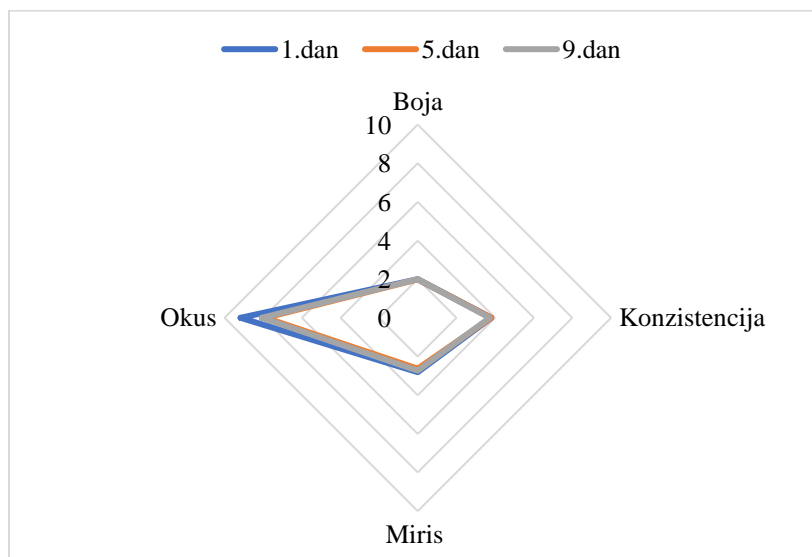
d)



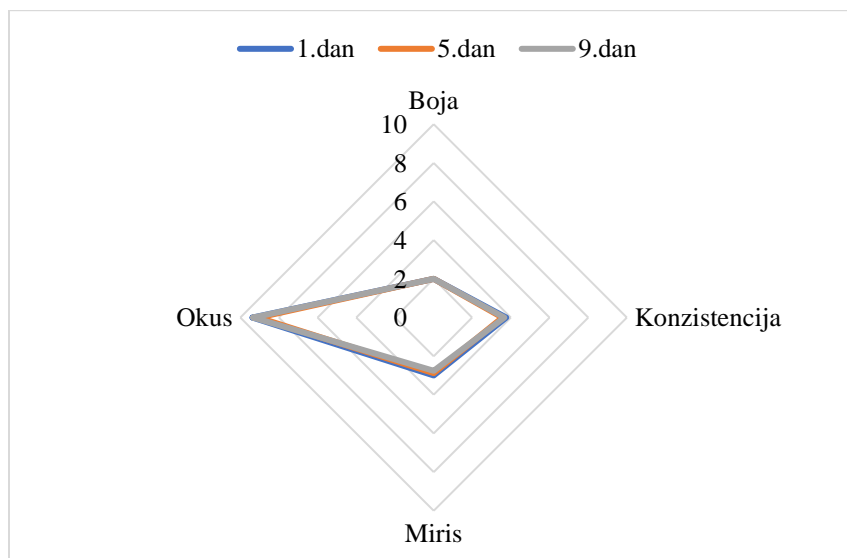
e)



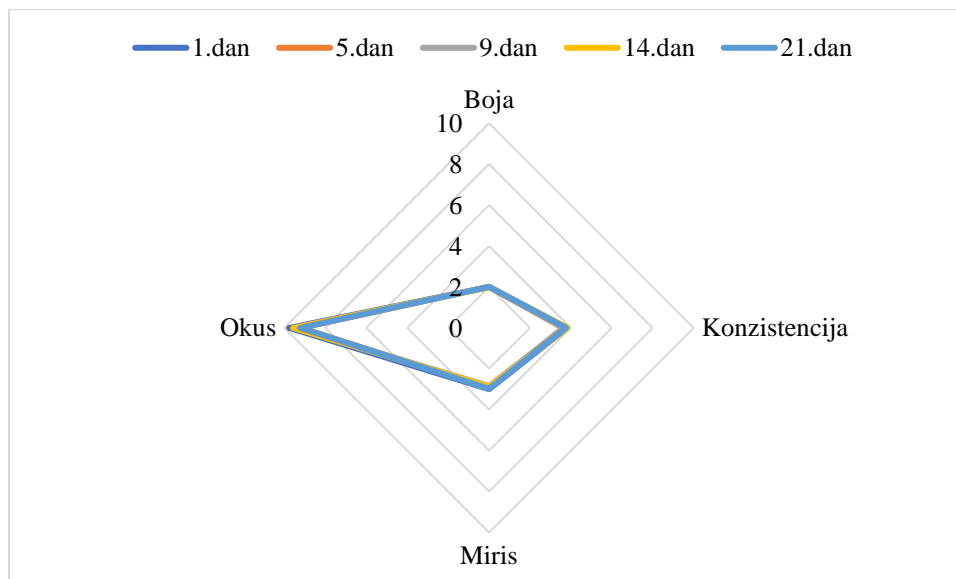
f)



g)



h)



Slika 7. Prosjek ponderiranih bodova za pojedinačna senzorska svojstva za različite uzorke sira a -uzorak BT01, b-MA11, c-PRO222, d-BT-01+s, e-MA11+s, f-PRO222+s, g-MA11-k, h-MA11+p

Senzorska analiza svježeg sira provedena je ocjenjivanjem uz pomoć obrasca za senzorsku analizu sa sustavom od 20 ponderiranih bodova. Tijekom analize ocjenjivani su okus, miris, tekstura i naknadni okus u ustima te izgled kore (površine), a svako navedeno svojstvo se ocjenjivalo ocjenom od 1 do 5. Nedostatak takve procjene korigirao se primjenom faktora značajnosti (F_v). Obrada podataka pokazala je da su uzorci bili dobrog okusa, te da ni jedan uzorak nije dobio ukupan broj bodova manji od 16. Može se vidjeti da su sa starenjem neki sirevi imali veće ocjene. U istraživanju koje su proveli Gonzalez-Fandos i sur. (2000) nakon 7 dana skladištenja senzorske karakteristike sira nisu bile zadovoljavajuće. Razvoju okusa u mliječnim fermentiranim proizvodima, posebice sirevima, rezultat je niza (bio) kemijskih procesa u kojima starter kulture osiguravaju enzime (Smit i sur., 2005). Poboljšanju okusa vjerojatno je doprinijela mliječna kiselina čiji razvoj kontrolira rast nepoželjnih mikroorganizama (Kosikowski, 1997a). Okus sireva poboljšao se i zbog metaboličkih procesa tijekom zrenja koji su odgovorni za osnovni okus te promjenu teksture (Smit i sur., 2005). Enzimskom degradacijom kazeina u peptide i aminokiseline, koji su potom glavni prekursori za nastanak hlapivih aromatskih spojeva dolazi do formiranja ključnog mirisa koji doprinosi osjetilnoj percepciji sira. Teško je izdvojiti najbolji uzorak no prema rezultatima senzorskog ocjenjivanja to bi bio uzorak MA11 uz dodatak protektivne kulture koji je dobio ukupan broj bodova 18,56 te je i ostale dane tijekom ispravnosti roka trajanja dobivao visoke ocjene. Također se može utvrditi da sirevi proizvedeni isključivo primjenom mezofilne kulture imaju bolji prosjek bodova nego sirevi proizvedeni primjenom mezofilne kulture i sirila. Iz rezultata prikazanih na slikama 7.a - h može se zaključiti da svi sirevi imaju visok broj ponderiranih bodova za boju te da se ona tijekom skladištenja praktički nije promijenila. Ti su rezultati u skladu s onima od Sant'Ana i sur. (2013) gdje su promjene boje bile minimalne tijekom skladištenja. Prema Wadhwani i McMahon (2012) boja sira može promijeniti percepciju okusa kod potrošača. Tijekom skladištenja sireva nije došlo ni do velikih promjena u konzistenciji te je broj ponderiranih bodova konstantan. Do najvećih je promjena tijekom skladištenja došlo u okusu i mirisu. Gledajući pojedina senzorska svojstva najveći broj ponderiranih bodova za okus dobili su sirevi MA11-k i MA11+p. Ti su sirevi imali i najveći udio mliječne masti koji pozitivno utječe na aromu sira. Mliječna mast ima i pozitivan utjecaj na konzistenciju sira. Ona u siru otapa spojeve nastale hidrolitičkom razgradnjom masti i proteina te sprječava nastajanje i stezanje čvrstoga proteinskoga

gumenog matriksa, koji čini kontinuiranu fazu sira, a koji bi bez mliječne masti u svojoj strukturi bio izrazito gumaste konzistencije (Havranek i sur., 2014).

4.5. TEKSTURA I BOJA

Tablica 15. Tekstura svježeg sira tijekom 21. dana skladištenja izražena kao maksimalna sila F_{\max} (N)

UZORAK	1.dan	5.dan	9.dan	14.dan	21.dan
	F_{\max} (N)				
MA11	0,8742	0,9218	1,4584	-	-
PRO222	1,2724	0,8573	1,6367	-	-
BT01	1,0415	1,1216	-	-	-
MA11 +s	1,0974	1,0772	-	-	-
PRO222+s	0,9088	0,9154	1,2726	-	-
BT01+s	0,8591	1,2728	1,1967	-	-
MA11-k	1,0555	1,2954	1,3516	-	-
MA11+ p	1,0877	1,2318	1,3410	1,6569	1,8256

Tablica 16. Svojstvo elastičnosti tijekom 21. dana skladištenja izraženo u N_m

	1.dan	5.dan	9.dan	14.dan	21.dan
	N_m				
MA11	0,008	0,004	0,003	-	-
PRO222	0,009	0,007	0,013	-	-
BT01	0,010	0,008	-	-	-
MA11 +s	0,018	0,005	-	-	-
PRO222+s	0,010	0,004	0,011	-	-
BT01+s	0,011	0,021	0,005	-	-
MA11-k	0,009	0,021	0,012	-	-
MA11+ P	0,006	0,004	0,009	0,013	0,017

Iz tablice 15. vidljivo je da tvrdoća sira s vremenom mijenja tj. da raste maksimalna sila koja je potrebna za probijanje sira. Teksturalne karakteristike sira određene su kombiniranim strukturnim svojstvima matriksa proteina i kapljicama masnoće ukomponiranim u matriks (Lobato-Calleros i sur., 2001). Kod svježeg sira manji je udio masnoće pa više neprekinutih zona proteina sastavlja strukturu sira. Kako se sadržaj masnoće smanjuje, više neprekinutih zona proteina. Kao posljedica toga dolazi do visokog stupnja umrežavanja molekula proteina što rezultira trodimenzionalnim mrežama, koje pokazuju visoku otpornost na deformaciju (Bryant et al., 1995; Lobato-Calleros et al., 2001). U istraživanju koje su proveli Esmer i sur. (2009) utrošeni rad i maksimalna sila za probijanje sireva opadala je tijekom vremena što se objašnjava povećanjem udjela proteolitičkih produkata. Najveća sila potrebna za proboj sira bila je potrebna kod uzorka MA11+p koji je proizveden uz dodatak protektivne kulture i iznosila je 1,8256 N.

Tablica 17. Boja svježeg sira izražena kroz vrijednosti L (svjetlina), a (zeleno), b (žuto) mjereno kroz 21 dan skladištenja

	Dan skladištenja	BT01	MA11	PRO222	BTO1+s	MA11+s	PRO222+s	MA11-k	MA11+p
L	1	94,98	95,22	95,70	93,60	94,42	94,79	88,13	94,78
	5	90,87	95,29	95,04	92,45	94,94	94,84	95,48	95,52
	9	94,84	94,48	-	-	94,03	94,72	94,49	94,95
	14	-	-	-	-	-	-	-	95,61
	21	-	-	-	-	-	-	-	94,81
a	1	-1,39	-1,27	-1,44	-1,17	-1,03	-0,99	-0,94	-1,38
	5	-1,36	-1,39	-1,43	-1,02	-1,02	-0,92	-1,06	-1,24
	9	-1,28	-1,34	-	-0,97	-1,08	-	-1,26	-1,31
	14	-	-	-	-	-	-	-	-1,29
	21	-	-	-	-	-	-	-	-1,28
b	1	8,90	8,59	8,84	9,48	9,71	9,63	8,92	9,32
	5	8,48	8,8	8,77	9,61	9,60	9,54	9,08	9,06
	9	8,81	8,49	-	9,27	9,94	-	9,03	9,22
	14	-	-	-	-	-	-	-	8,91
	21	-	-	-	-	-	-	-	9,14

U tablici 17. može se vidjeti da nije došlo do značajnih promjena boje u uzorcima sireva tijekom skladištenja. Boja sira može se opisati kao bijela, te se njezin intenzitet nije pretjerano mijenjao. Kako je prolazio period skladištenja mogla se primijetiti blago žuta nijasna što je i vidljivo u porastu b vrijednosti. Prema Saldo i sur. (2002) promjene u boji sira povezane su sa promjenama u mikrostrukturi nakon pasterizacije. U nekim je uzorcima je vjerojatno došlo do degradacije karotenoida i riboflavina zbog izlaganja svjetlosti te je zbog toga pala L vrijednost (Marasović, 2017). Prisutnost kisika dovodi do oksidacije i to je vidljivo na promjeni boje (Del Nobile i sur., 2009). Vrijednosti L,a i b u većini slučajeva su bile u padu, osim kod sireva MA11+p gdje su L i a vrijednost bile u rastu pa se može pretpostaviti da su protektivne kulture djelovale inhibitory na oksidaciju. Protektivne kulture imaju antimikrobno djelovanje, na način da proizvode specifične metabolite kao što su organske kiseline (mliječna, octena i propionska) i kompetitivno se natječu s uzročnicima kvarenja za nutrijente i kisik (Young i Sullivan, 2011).

4.6. MINERALNI SASTAV

Tablica 18. Mineralni sastav različitih uzoraka svježeg sira

UZORAK	Na $\mu\text{g kg}^{-1}$	Mg $\mu\text{g kg}^{-1}$	Ca $\mu\text{g kg}^{-1}$	Zn $\mu\text{g kg}^{-1}$	Mn $\mu\text{g kg}^{-1}$	Fe $\mu\text{g kg}^{-1}$
BT01	$3,64 \times 10^5$	$1,08 \times 10^5$	$1,17 \times 10^6$	$6,38 \times 10^3$	59,93	$3,16 \times 10^3$
MA11	$3,68 \times 10^5$	$1,12 \times 10^5$	$1,20 \times 10^6$	$5,91 \times 10^3$	34,49	$7,96 \times 10^2$
PRO222	$36,5 \times 10^5$	$1,15 \times 10^5$	$1,19 \times 10^6$	$7,21 \times 10^3$	58,73	$5,89 \times 10^2$
BT01	$3,45 \times 10^5$	$1,11 \times 10^5$	$1,12 \times 10^6$	$8,16 \times 10^3$	37,85	$1,20 \times 10^3$
MA11	$3,35 \times 10^5$	$1,08 \times 10^5$	$1,14 \times 10^6$	$5,89 \times 10^3$	34,62	$7,54 \times 10^2$
PRO222	$3,46 \times 10^5$	$1,07 \times 10^5$	$1,17 \times 10^6$	$7,05 \times 10^3$	138,34	$8,45 \times 10^2$
MA11-k	$3,39 \times 10^5$	$1,02 \times 10^5$	$1,10 \times 10^6$	$5,81 \times 10^3$	34,59	$7,79 \times 10^2$
MA11+P	$3,45 \times 10^5$	$1,04 \times 10^5$	$1,13 \times 10^6$	$6,15 \times 10^3$	80,12	$9,41 \times 10^2$

Konzumacija sira, od velikog je nutritivnog značaja prvenstveno zbog mikronutrijenata i to minerala (Lucas i sur., 2008). Sirevi sadržavaju bitnu količinu mineralnih tvari, a udjel kalcija i fosfora u siru gotovo je najvažniji kao i u mlijeku (Tratnik i Božanić, 2012). U tablici 18. prikazan je mineralni sastav sireva tijekom prvog dana uzorkovanja. Iz tablice je vidljivo da dodatak sirila i protektivne kulture ne utječe na mineralni sastav svježeg sira. Mineralni sastav mlijeka ovisi o nekoliko faktora kao što su: genetska svojstva, faza laktacije, vrsta pašnjaka, kontaminacija tla i itd. (Gonzalez-Martin i sur., 2011). U usporedbi s drugim sirevima svježi sir sadrži najmanji udio mineralnih tvari, osobito kalcija i fosfora jer kiselina otapa Ca i P iz micela kazeina te oni odlaze u kiselu sirutku. Prema Foxu (1999) prosječan udio kalcija u svježem siru je $90 \text{ mg (100g)}^{-1}$ dok je upotrebom ovih starter kultura dobiven udio kalcija u prosjeku $1000 \text{ mg (100g)}^{-1}$.

5. ZAKLJUČCI:

Na temelju izvršenih analiza, dobivenih rezultata i provedene rasprave, može se zaključiti slijedeće:

1. Dodatak sirila uzrokovao je veću čvrstoću gruša, manji prinos sira te manji udio vode u siru. Najveći je prinos sira bio uz dodatak mezofilne kulture CHOMA11, dok je najmanji prinos bio uz dodatak mezofilne kulture BT01 i sirila.
2. S vremenom se pH vrijednost sira povećavala, dok se titracijska kiselost snižavala što je vjerojatno povezano s nastankom mliječne kiseline prilikom fermentacije kao i oslobađanjem CO₂ koji potiče nastanak karbonske kiseline.
3. Prema rezultatima mikrobiološke analize trajnost uzorka sira proizvedenog uz dodatak protektivne kulture produljen je za 12 dana u odnosu na kontrolni uzorak te je iznosio 21 dan.
4. U istraživanju nije dokazan utjecaj odabrane mezofilne kulture na tvrdoću i elastičnost sira.
5. Bodovi pri senzorskoj analizi sira bili su visoki i u prosjeku su iznosili između 16,43-18,56. Sirevi uz dodatak samo mezofilne kulture imali su veće ocjene nego sirevi uz dodatak mezofilne kulture i sirila. Teško je izdvojiti najbolji uzorak no prema ocjenama to bi bio uzorak MA11 uz dodatak protektivne kulture koji je dobio ocjenu 18,56 te je i ostale dane tijekom ispravnosti roka trajanja dobivao visoke ocjene.
6. Prema rezultatima mjerenja boje, utvrđene L*, a* i b* vrijednosti bile su veće za uzorak sira proizveden uz dodatak protektivne kulture. Tako je ovaj uzorak bio svjetliji od ostalih, a tijekom skladištenja došlo je do pojave žute boje što je vjerojatno povezano s degradacijom karotenoida i riboflavina.
7. Najzastupljenije mineralne tvari u svim uzorcima sira bili su Ca, Na, Mg, Zn, Fe i Mn.

6. LITERATURA

Anonymous 1 (2018) Protektivne kulture,

<<http://termi.rgf.bg.ac.rs/Dodaj/PojedinacniPrikaz?id=111013>>. Pristupljeno 1 rujna.2018.

Abd El-Gawad, M. A. M., Ahmed, N.S. (2011) Cheese yield as affected by some parameters Review. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.* **10(2)**, 131-153.

Ardö, Y. (2006). Flavour formation by amino acid catabolism. *Biotechnology advances* **24(2)**, 238-242.

Aleandri, R., Schneider, J.C., Buttazzoni, L.G. (1989) Evaluation of Milk for Cheese Production Based on Milk Characteristics and Formagraph Measures. *J. Dairy Sci.* **72**, 1967-1975.

Babić M. (2009) Utjecaj dodatka meda na fermentaciju kravljeg, kozjeg i sojinog mlijeka baterijom *Lactobacillus casei* – 01, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek.

Bardasi, L., Taddei, R., Nocera, L., Ricchi, M., Merialdi, G. (2015). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in meat and vegetable products in Emilia Romagna Region, years 2012-2013. *Italian journal of food safety*, **4(1)**.

Bilandžić, N., Gačić, M., Đokić, M., Sedak, M., Ivanec Šipušić, Đ., Končurat, A., Tlak Gajger, I. (2014) Major and trace elements levels in multifloral and unifloral honeys in Croatia. *J. Food Compos. Anal.* **33**, 123-138.

Bockelmann, W. (2010) Secondary Cheese Starter Cultures. U: Technology of Cheesemaking (Law, B.A. i Tamime, A.Y., ured.) Blackwell Publishing Ltd., 2.izd., West Sussex, 193-224.

Božanić, R. (2015) Vrste sireva i značaj u prehrani ljudi. U: Sirarstvo u teoriji i praksi (Matijević, B.), Veleučilište u Karlovcu, Karlovac, str. 47-57.

Božanić, R., Jeličić, I., Bilušić, T. (2010) Analize mlijeka i mliječnih proizvoda, Plejada, Zagreb.

Brito, J. R. F., Santos, E. M. P., Arcuri, E. F., Lange, C. C., Brito, M. A. V. P., Souza, G. N. (2008) Retail survey of Brazilian milk and Minas frescal cheese and a contaminated dairy plant to establish prevalence, relatedness, and sources of *Listeria monocytogenes* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 4954-4961.

- Bryant, A., Ustunol, Z., Steve, J. (1995) Texture of Cheddar Cheese as Influenced by Fat Reduction. *J. Food Sci.* **60**, 1216-1219.
- Callon, C., Gilbert, F. B., De Cremoux, R., Montel, M.-C. (2008) Application of variable number of tandem repeat analysis to determine the origin of *S. aureus* contamination from milk to cheese in goat cheese farms. *Food Control.* **19**(2), 143-150.
- Cindrić, M. (1997) Proizvodnja svježeg sira Schulenburgovim postupkom. *Mljekarstvo* **47**, str 195-199.
- Cogan, T. M. (2011) Microbiology of Cheese. Elsevier.
- Dalton, C.B., Austin, C.C., Sobel, J. (1997): An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. *N. Engl. J. Med.* **336**, 100-105.
- De Fátima Poças, M., Pintado, M. (2010) Packaging and the Shelf Life of Cheese. U: Food packaging and shelf life a practical guide (Robertson, G. L. Ured.), Taylor & Francis Group, Boca Raton, str. 103-126.
- Del Nobile, M. A., Conte, A., Incoronato, A., L., Panza, O. (2009) Modified atmosphere packaging to improve the microbial stability of Ricotta. *African J. Microbiol. Res.* **3** (4) str. 137-142.
- Dermiki, M., Ntzimani, A., Badeka, A., Savvaidis, I. N., & Kontominas, M. G. (2008). Shelf-life extension and quality attributes of the whey cheese “Myzithra Kalathaki” using modified atmosphere packaging. *LWT-Food Science and Technology* **41**(2), 284-294.
- Dimitrijević-Branković, S.I. (2003) Bioprotektivni agensi u kontroli zdravstvene bezbednosti. *Hemijska industrija* **57**, 479-485.
- El-Gawad, M. A., Ahmed, N. S. (2011). Cheese yield as affected by some parameters review. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, **10**(2), 131-153.
- Filajdić, M., Ritz, M., Vojnović, V. (1988) Senzorska analiza mliječnih proizvoda. *Mljekarstvo*, **38**, 295-301.
- Filtenborg O.J., Frisvad C., Thrane U. (1996) Moulds in food spoilage, *Int. J. Food Microbiol.* **33**, 85–102.
- Fleet G. H. (1990) Yeast in dairy products. *J. Appl. Microbiol.* **68**, 199-211.

Fox, P. F., McSweeney, P. L. H., Cogan, T. M., Guinee T.P. (2004) Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Major Cheese Groups, 3. izd., Academic Press London, UK.

Giammanco G. M., Pepe A., Aleo A., D'Agostino V., Milone S., Mammina C. (2011) Microbiological quality of Pecorino Siciliano “primosale” cheese on retail sale in the street markets of Palermo, Italy. *New Microbiol.* **34** (2), 179–185.

Gonzalez-Fandos, E., Sanz, S., Olarte, C. (2000) Microbiological, physicochemical and sensory characteristics of Cameros cheese packaged under modified atmospheres. *Food Microbiol.* **17**, 407-414.

González-Martín, I., Hernández-Hierro, J.M., Revilla, I., Vivar-Quintana, A., Lobos Ortega, I. (2011) The mineral composition (Ca, P, Mg, K, Na) in cheeses (cow's, ewe's and goat's) with different ripening times using near infrared spectroscopy with a fibre-optic probe. *Food Control.* **127**, 147-152.

Gutierrez-Mendez, N., Trancoso-Reyes, N., Yarely Leal-Ramos, M. (2013) Texture profile analysis of Fresh cheese and Chihuahua cheese using miniature cheese models. *Tecnociencia Chihuahua* **7**, 65-74.

Hati, S., Mandal, S., Prajapati, J. B. (2013). Novel starters for value added fermented dairy products. *Current Research in Nutrition and Food Science Journal*, **1**(1), 83-91.

Havranek, J., Kalit, S., Antunac, N., Samaržija, D. (2014) Sirarstvo, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.

Hinrichs, J. (2001) Incorporation of whey proteins in cheese. *Int. Dairy J.* **11**, 495-503.

Hrvatska agencija za hranu (2016) Znanstveno mišljenje o mikrobiološkim opasnostima u svježim i polutvrđim sirevima na tržnicama RH i njihovim kemijskim parametrima, <<https://www.hah.hr/wp-content/uploads/2015/10/ZM-o-mikrobioloskim-opasnostima-u-svjezim-i-polutvrdim-sirevima.pdf>>. Pristupljeno 16. travnja 2018.

Hrvatski zavod za norme (2017) Poljoprivredni i prehrambeni proizvodi -- Opće upute za određivanje dušika Kjeldahlovom metodom (ISO 1871:2009), HZN.

- Johnson, E.A., Nelson, J.H., Johnson, M. (1990) Microbiological safety of cheese made from heat-treated milk. Part 1. Executive summary, introduction and history. *J. Food Prot.* **53**, 441–452.
- Kalit, S. (2015) Opće sirarstvo. U: Sirarstvo u teoriji i praksi (Matijević, B.), Veleučilište u Karlovcu, Karlovac, str. 29 - 46.
- Kizilirmak Esmer, O., Balkir P., Seckin K. A., Irkin, R. (2009) The Effect of Modified Atmosphere and Vacuum Packaging on the Ohysichemical, Microbiological, Sensory and Textural Properties of Crottin de Chavignol Cheese. *Food Sci. Technol. Res.* **15** (4) str. 367-376.
- Kousta M., Mataragas, M., Skandamis P., Drosinos, E.H. (2010): Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels. *Food Control* **21**, 805-815.
- Kosikowski F.V., Mistry V.V. (1997a) Cheese and Fermented Milk Foods. 3.izd., FV Kosikowski LLC, USA.
- Kubat, S., Stienidl, J., Wimmer, S., Sarić, Z., Blažić, M., Pavić, K. (2015) Svijet sira, Veleučilište u Karlovcu, Karlovac.
- Laboratorij za tehnološke operacije (2008) Stable Micro Systems Texture Analyser TA.HD.plus, <http://www.pbf.unizg.hr/znanstveni_i_strucni_rad/katalog_opreme/zavod_za_procesno_inzenjerstvo/laboratorij_za_tehnoske_operacije>. Pristupljeno 26. ožujka 2018.
- Lante, A., Lomolino, G., Cagnin, M., Spettoli, P. (2006) Content and characterisation of minerals in milk and in Crescenza and Squacquerone Italian fresh cheeses by ICP – OES. *Food Control* **17**, 229 – 233.
- Lobato-Calleros, C., Robles-Martínez, J. C., Caballero-Pérez, J. F., Aguirre-Mandujano, E., Vernon-Carter, E. J. (2001) Fat replacers in low-fat mexican manchego cheese. *J. Texture Stud.* **32**, 1–14.
- Lucas, A., Andueza, D., Rock, E., Martin B. (2008) Prediction of dry matter, fat, pH, vitamins, minerals, carotenoids, total antioxidant capacity, and color in fresh and freeze-dried cheeses by visible-near-infrared reflectance spectroscopy. *J. Agr. Food Chem.* **56**, 6801–6808.
- Marasović, I. (2017) Održivost svježeg sira pakiranog u vakumu i modificiranoj atmosferi. Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb.

Markov, K., Frece, J., Čvek, D., Delaš, F. (2009) *Listeria monocytogenes* i drugi kontaminanti u svježem siru, *Mljekarstvo* **59** (3), 225-231.

Matijević, B. (2015) Dodaci u proizvodnji sira i njihov značaj. U: *Sirarstvo u teoriji i praksi* (Matijević, B.), Veleučilište u Karlovcu, Karlovac, 103 – 112.

McSweeney, P.L.H. (2007). Flavor, texture and flavor defects in hard and semi-hard cheeses. U: *Cheese Problems Solved*, (McSweeney P.L.H., ured.) Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, 189–207.

NACMCF (1991) *Listeria monocytogenes*: recommendations by the National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods. *Int. J. Food Microbiol.* **14**, 185-246.

Ooi, S.T., Lorber, B. (2005) Gastroenteritis due to *Listeria monocytogenes*. *Clin. Infect. Dis.* **40**, 1327-1332.

Panday, A., Joshi, V.K., Nigam, P., Soccol, C.R. (1999) Enterobacteriaceae, coliforms and *E. coli*. U: *Encyclopedia of Food Microbiology*, (Robinson, R.K., Batt, C.A., Patel, P.D. ured.), Accademic Press, Amsterdam, str. 604-610.

Pravilnik o metodama analiza toplinski obrađenog mlijeka za prehranu ljudi (2007) *Narodne novine* **133**, Zagreb.

Pravilnik o sirevima i proizvodima od sireva (2013) *Narodne novine* **141**, Zagreb.

Radeljević, B., Mikulec, N., Antunac, N., Prpić, Z., Maletić, M., Havranek, J. (2013) Utjecaj mikrobne kulture na koncentraciju ukupnih slobodnih aminokiselina tijekom zranja Krčkog sira. *Mljekarstvo* **63** (1), 15 – 21.

Sabadoš, D. (1998): Kontrola i ocjenjivanje kvalitete mlijeka i mliječnih proizvoda, Hrvatska mlijekarska udruga, Zagreb.

Sant'Ana, A.M.S., Bezerril, F.F., Madruga, A.S.M., Batista, A.S.M., Magnani, M., Souza, E.L., Queiroga, R.C.R.E. (2013) Nutritional and sensory characteristics of Minas fresh cheese made with goat milk, cow milk, or a mixture of both. *J. Dairy Sci.* **96**, 7442 – 7453.

Saldo, J., Sendra, E., Guamis, B. (2002) Color changes during ripening of high pressure treated hard caprine cheese. *High Pressure Research* **22**, 659–663.

Samaržija, D., Damjanović, S., Pogačić, T. (2007) *Staphylococcus aureus* u siru. *Mljekarstvo* **57** (1), 31 – 48.

Smit G., Smit B.A., Wim J.M., Engels J.M. (2005) Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavor profiling of cheese products. *FEMS Microbiol. Lett.* **29**, 591–610.

Smits G.J., Brul S. (2005) Stress tolerance in fungi – to kill a spoilage yeast. *Curr. Opin. Biotechnol.* **16**, 225–230.

Suomalainen, T.H., Mäyrä-Mäkinen, A.M. (1999) Propionic acid bacteria as protective cultures in fermented milks and breads. *Dairy Science & Technology* **79**, 165-174.

Telis-Romero, J., Váquiro, H.A., Bon, J., Benedito, J. (2011) Ultrasonic assessment of fresh cheese composition. *J. Food Eng.* **103**, 137-146.

Temelli, S., Anar, Ş., Sen, C., & Akyuva, P. (2006). Determination of microbiological contamination sources during Turkish white cheese production. *Food Control* **17**(11), 856-861.

Tratnik Lj. (1998) Mlijeko – tehnologija, biokemija i mikrobiologija, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.

Tratnik, Lj., Božanić, R. (2012) Mlijeko i mliječni proizvodi, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.

Turić, D. (2017) Iskustva u proizvodnji mekog sira u jednoj prehrambenoj industriji. Veleučilište u Požegi, Požega.

Valkaj, K., Kalit, S., Salajpal, K., Zubović, M., Marković, T. (2014) Chemical and Microbiological Characterization of Turoš Cheese. *Agric. Conspec. Sci.* **79**, 201-207.

Verraes, C., Vlaemynck, G., Van Weyenberg, S., De Zutter, L., Daube, G., Sindic, M., Uyttendaele, M., Herman, L. (2015) A review of the microbiological hazards of dairy products made from raw milk. *Int. Dairy J.* **50**, 32-44.

Vodič za mikrobološke kriterije za hranu (2009) Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja, Zagreb.

Wadhwani, R., McMahon, D. J. (2012) Color of low-fat cheese influences flavor perception and consumer liking. *J. Dairy Sci.* **95**:2336–2346.

Walstra, P., Geurts, T. J., Noomen, A., Jellema, A., Van Boekel, M. A. J. S. (1999) Microbiology of Milk. U: Dairy Technology, Principles of Milk Properties and Processes, (Dekker, M., ured.) Inc, New York, 149-170.

Young, N.W.G., O'Sullivan, G.R. (2011) 5 - The influence of ingredients on product stability and shelf life. U: Food and beverage stability and shelf life (Kilcast, D., Subramaniam, P., ured.) Woodhead Pub, Oxford, str. 132-183.

Zakon o higijeni hrane i mikrobiološkim kriterijima za hranu (2013) *Narodne novine* **81**, Zagreb.

IZJAVA O IZVORNOSTI

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Marta Rešić